

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA - ICET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA
RECURSOS AMAZÔNICOS - PPGCTRA**

JANDER SAVEDRA NUNES

**CONTRIBUIÇÕES EM MORFOANATOMIA FOLIAR, FITOQUÍMICA, ALELOPATIA
E CARACTERES FARMACOGNÓSTICOS PRELIMINARES DE *Piper marginatum*
Jacq. (Piperaceae), DE ITACOATIARA, MÉDIO RIO AMAZONAS**

**ITACOATIARA - AM
2019**

JANDER SAVEDRA NUNES

**CONTRIBUIÇÕES EM MORFOANATOMIA FOLIAR, FITOQUÍMICA, ALELOPATIA
E CARACTERES FARMACOGNÓSTICOS PRELIMINARES DE *Piper marginatum*
Jacq. (Piperaceae), DE ITACOATIARA, MÉDIO RIO AMAZONAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Amazonas, pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. RANIERI CAMPOS
COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. ISABEL REIS GUESDON

**ITACOATIARA - AM
2019**

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

N972c Nunes, Jander Savedra
Contribuições em morfoanatomia foliar, fitoquímica, alelopatia e caracteres farmacognósticos preliminares de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae), de Itacoatiara, médio Rio Amazonas / Jander Savedra Nunes. 2019
98 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Ranieri Campos
Coorientadora: Isabel Reis Guesdon
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. aleloquímicos. 2. germinação e crescimento. 3. vitexina. 4. idioblastos secretores. 5. compostos fenólicos. I. Campos, Ranieri II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Jander Savedra Nunes

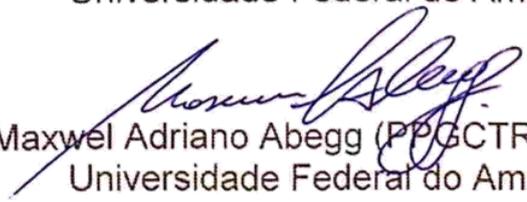
Contribuições em morfoanatomia foliar, fitoquímica, alelopatia e caracteres farmacognósticos preliminares de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae), de Itacoatiara, médio Rio Amazonas.

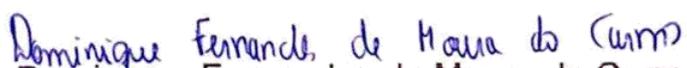
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado em 12 de agosto de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Ranieri Campos (PPGCTRA-ICET/UFAM) (Presidente)
Universidade Federal do Amazonas


Dr. Maxwell Adriano Abegg (PPGCTRA-ICET/UFAM)
Universidade Federal do Amazonas


Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo (ICET/UFAM)
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

"Bem sei eu que tudo podes, e que nenhum dos teus propósitos pode ser impedido."
(Jó 42:2 – BÍBLIA ACF2007)

A Deus, por permitir esta jornada e guiar os meus passos.

Aos meus pais Azemar e Josabete, pelo amor e ensinamentos para a vida.

À minha esposa Elen, pelo seu amor e sua perseverança; por amenizar muitas de minhas dores e caminhar lado-a-lado.

À minha filha Alice, pelo amor e doçura da sua companhia.

Aos meus irmãos em Cristo, pelos incentivos e pelo refrigério de suas orações.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ranieri Campos, pela confiança e oportunidade a mim dispensadas, pela amizade, companheirismo, lições e preciosos direcionamentos.

À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Isabel Reis Guesdon, por seu companheirismo, tempo, dedicação, e por me encantar com as análises morfoanatômicas e histoquímicas.

À minha colega, amiga e "mais chegada que uma irmã" Sâmia Raysa Pinto Nogueira, minha companheira acadêmica incansável e usada por Deus para que eu chegasse até aqui, por sua amizade, ânimo, tempo, dedicação, zelo, conhecimento e sofrimento compartilhados. Deus a abençoe mais e mais!

Ao Prof. MSc. Nicanor Tiago Bueno, pela experiência, dedicação, paciência e direção na interpretação das análises estatísticas.

Aos membros do Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), especialmente Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Gáspari Dias, Prof.^a Dr.^a Cristiane da Silva Paula, Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Warumby Zanin e Prof.^a Dr.^a Marilis Dalarmi Miguel, por disponibilizarem o laboratório para execução de nossas análises, pelo companheirismo, direcionamento e boa recepção em Curitiba - PR.

À Dr.^a Maria da Graça Teixeira de Toledo, responsável pela Central Analítica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela disposição e auxílio durante as análises cromatográficas.

À Prof.^a Dr.^a Cristina Peitz de Lima e Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia P. dos Santos, pelos ensinamentos, solicitude e apoio na execução das análises de potencial antibacteriano realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UNIBRASIL) – Curitiba - PR.

Às minhas irmãs Ádria, Lucélia, Gracilete e Luane, e meus sobrinhos Sofia, Hadassa, Maria Júlia, Jasmim e Arthur. À minha avó Blanca, demais familiares e amigos; amados que me inspiraram, incentivaram-me nesta jornada e compreenderam o meu tempo diminuído.

À Ilze Dourado Campos, Jorgea Tânia Amazonas Barros e Raissa Carvalho de Matos, pela amizade, esforço e apoio na coleta botânica e parte experimental.

Aos meus colegas de laboratório, demais servidores e gestores da Universidade Federal do Amazonas, pelo incentivo à qualificação profissional.

Ao Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA), pela oportunidade.

Ao Soberano Deus-Trino
Aos meus pais Azemar e Josabete
À minha esposa Elen
À minha filha Alice

DEDICO.

*Este trabalho já cumpriu metade de seu
objetivo: transformou o seu autor.
O autor, 2019.*

RESUMO

O conhecimento de plantas sempre foi útil à humanidade, que cada vez mais tecnológica, tem aprofundado seus estudos dos recursos vegetais para ser sustentável. Os fitoconstituintes bioativos de plantas constituem uma fonte promissora a ser explorada, e entre eles, muitos compostos de plantas do gênero *Piper* (Piperaceae) têm sido identificados. *Piper* tem importância ecológica, econômica e terapêutica. Suas cerca de 2.000 espécies tem taxonomia complexa, e erros de identificação e uso são comuns. Por isso há necessidade de melhor caracterização das espécies desse gênero. *Piper marginatum* Jacq. é uma espécie de *Piper* amplamente usada na medicina tradicional. Entre suas classes de metabólitos estão terpenoides, fenilpropanoides e flavonoides, possuindo propriedades como antifúngica e antimicrobiana, porém não há estudos em alelopatia. Este estudo investigou os padrões morfológicos e histoquímicos da folha de *P. marginatum* e seus potenciais fitoquímico, alelopático e antibacteriano. Folhas de *P. marginatum* foram coletadas e fixadas em campo e submetidas a análises morfoanatômicas e histoquímicas, seguindo métodos clássicos. Extrato das folhas e suas frações foram obtidos para avaliar o perfil fitoquímico por ensaios colorimétricos e por cromatografia à líquido de alta eficiência. O potencial alelopático do extrato e frações foi investigado por medidas de germinação e crescimento, e a atividade antibacteriana por difusão em disco. *P. marginatum* possui um formato cordado típico com margem ciliada composta por tricomas tectores, e a presença de dois tipos de idioblastos secretores parece ser uma característica potencial para sua diferenciação. Esses caracteres morfoanatômicos têm potencial taxonômico e reforçam sua proximidade com outras espécies do gênero. Os resultados histoquímicos comprovaram a produção de compostos fenólicos, alcaloides, polissacarídeos e óleos essenciais nas folhas de *P. marginatum*. O extrato bruto (EB) rendeu 3,03%; fração hexano (FH): 31,13%, fração clorofórmio (FC): 1,25%, e fração acetato de etila (FA): 0,97%. Na fitoquímica foram encontrados compostos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianidinas e fitoesteróis. Comprovada atividade alelopática do extrato bruto e frações influenciaram significativamente o Índice de Velocidade de Germinação e o crescimento das espécies testadas, especialmente nas concentrações de 500 µg/mL. As cepas de bactérias testadas não foram sensíveis às amostras deste trabalho. O flavonoide vitexina foi identificado. Com isso, as contribuições deste trabalho consistem em um potencial auxílio à taxonomia e à fitoquímica, além de significativo parâmetro para futuros estudos em alelopatia e outras atividades biológicas em *P. marginatum*. Adicionalmente os achados botânicos e dados farmacognósticos fornecem parâmetros para o controle de qualidade de potenciais fitoterápicos, além de poder servir de auxílio em estudos de uso seguro de plantas medicinais por povos nativos.

Palavras-chaves: aleloquímicos, germinação e crescimento, Amazônia, compostos fenólicos, idioblastos secretores e vitexina.

ABSTRACT

Plant knowledge has always been useful to humanity, which is increasingly technological, has deepened its studies of plant resources to be sustainable. Bioactive plant phytochemicals are a promising source to be explored, and among them, many plant compounds of the genus *Piper* (Piperaceae) have been identified. *Piper* has ecological, economic and therapeutic importance. Its about 2,000 species have complex taxonomy, and errors in identification and use are common. Therefore, there is a need for a better characterization of the species of this genus. *Piper marginatum* Jacq. is widely used in traditional medicine. Among its classes of metabolites are terpenoids, phenylpropanoids and flavonoids, possessing properties like antifungal and antimicrobial, however there are no studies in allelopathy. This study investigated morphological and histochemical patterns of *P. marginatum* leaf and its phytochemical, allelopathic and antibacterial potentials. *P. marginatum* leaves were collected and fixed in the field and submitted to morphological and histochemical analysis, following classical methods. Extract from the leaves and their fractions were obtained to evaluate the phytochemical profile by colorimetric assays and in High Performance Liquid Chromatography. The allelopathic potential of the extract and fractions was investigated by measures of germination and growth, and antibacterial activity by disk diffusion. *P. marginatum* has typical cordate shape with ciliated margin composed by tector trichomes, and the presence of two types of secretory idioblasts seems to be potential traits to their differentiation. These morphoanatomical characters has taxonomical potential and reinforce their proximity with other species of the genus. The histochemical results proved the production of phenolic compounds, alkaloids, polysaccharides and essential oils in the *P. marginatum* leaves. The crude extract (EB) yielded 3.03%; hexane fraction (FH): 31.13%, chloroform fraction (FC): 1.25%, and ethyl acetate fraction (FA): 0.97%. In phytochemistry were found phenolic compounds, flavonoids, tannins, anthocyanidins and phytosterols. Proven allelopathic activity of the crude extract and fractions significantly influenced the Germination Speed Index and the growth of the tested species, especially at concentrations of 500 µg/mL. The strains of bacteria tested were not sensitive to the samples of this work. The flavonoid vitexin was identified. Thus, the contributions of this work are a potential aid to taxonomy and phytochemistry, as well as a significant parameter for future studies on allelopathy and other biological activities in *P. marginatum*. Additionally, botanical findings and pharmacognostic data provide parameters for the quality control of phytotherapeutic potentials, as well as being able to assist in studies of safe use of medicinal plants by native peoples.

Key-words: allelochemicals, germination and growth, amazon rainforest, phenolic compounds, secretory idioblasts and vitexina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Família Piperaceae e gênero <i>Piper</i> L.	19
2.2 Metabólitos secundários de <i>Piper</i> e suas atividades biológicas	21
2.3 <i>Piper marginatum</i> Jacq.	24
2.3.1 Estrutura química de alguns compostos de <i>P. marginatum</i> já identificados.....	28
2.4 Estudos morfoanatômicos e histoquímicos	30
2.5 Compostos fenólicos	31
2.6 Potencial alelopático	32
2.6.1 Alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) e cebola (<i>Allium cepa</i> L.) como plantas-teste	33
2.7 Potencial antimicrobiano	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Coleta das folhas para obtenção do extrato bruto e frações	36
4.2 Reagentes, solventes e equipamentos	36
4.3 Coleta das folhas de <i>P. marginatum</i> para herborização e fixação	37
4.4 Obtenção do extrato bruto e frações	38
4.5 Parâmetros físico-químicos para a qualidade de amostra vegetal	39
4.5.1 Determinação dos teores de água das folhas frescas e de umidade das folhas secas de <i>P. marginatum</i>	39
4.5.2 Determinação do teor de cinzas totais das folhas secas de <i>P. marginatum</i>	39
4.6 Análise fitoquímica	39
4.6.1 Determinação do conteúdo total de clorofilas A e B, e carotenoides	40
4.6.2 Determinação do conteúdo total de fenólicos	40
4.6.3 Determinação do conteúdo total de taninos	41
4.6.4 Determinação do conteúdo total de flavonoides	42
4.6.5 Determinação do conteúdo total de antocianinas	42
4.6.6 Determinação do conteúdo total de fitoesteroides	43
4.6.7 Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE)	44
4.7 Estudos anatômicos e histoquímicos	45

4.8 Análise do potencial alelopático	46
4.8.1 Ensaio de germinação	46
4.8.2 Ensaio de crescimento	47
4.9 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do fosfomolibdênio.....	47
4.10 Análise do potencial antibacteriano.....	48
4.11 Análise de dados	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Rendimentos dos processos de extração e particionamento	50
5.2 Parâmetros físico-químicos para a qualidade de amostra vegetal.....	52
5.2.1 Teores de água das folhas frescas e umidade das folhas secas de <i>P. marginatum</i>	52
5.2.2 Teor de cinzas totais das folhas secas de <i>P. marginatum</i>	53
5.3. Quantificação de importantes metabólitos	54
5.3.1 Determinação do conteúdo total de clorofilas A e B, e carotenoides	55
5.3.2 Determinação do conteúdo total de fenólicos	56
5.3.3 Determinação do conteúdo total de taninos	58
5.3.4 Determinação do conteúdo total de flavonoides	59
5.3.5 Determinação do conteúdo total de antocianinas	60
5.3.6 Determinação do conteúdo total de fitoesteroides	60
5.4 Resultado da Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE).....	62
5.5 Análises morfoanatômica e histoquímica de folha de <i>P. marginatum</i>.....	64
5.6 Análise do potencial alelopático	69
5.6.1 Ensaio de germinação e crescimento de alface (<i>L. sativa</i>).....	70
5.6.2 Ensaio de germinação e crescimento de cebola (<i>A. cepa</i>)	73
5.7 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do fosfomolibdênio.....	77
5.8 Atividade antibacteriana	78
6 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial de Piperaceae.....	19
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>P. marginatum</i> por estado do Brasil.....	25
Figura 3 - <i>P. marginatum</i> em campo de coleta, cidade de Itacoatiara, Amazonas – Brasil (3°08'47.3"S 58°26'56.2" W)	25
Figura 4 - Porcentagem por classes de metabólitos considerando 116 fitoquímicos identificados de folha de <i>P. marginatum</i>	27
Figura 5 - Estrutura química de alguns compostos de <i>P. marginatum</i> já identificados.....	29
Figura 6 - Estrutura química de três compostos (1, 2 e 3) identificados apenas em <i>P. marginatum</i>	30
Figura 7 - Representação esquemática do desenvolvimento experimental.....	36
Figura 8 - Exsicata de <i>P. marginatum</i>	37
Figura 9 - Ilustração do gradiente de eluição em CLAE (C-18 fase reversa) em corrida de 40 minutos para a verificação do perfil cromatográfico do extrato bruto e frações de <i>P. marginatum</i>	44
Figura 10 - Regiões da folha de <i>P. marginatum</i> retiradas para análises morfoanatômicas e histoquímicas (A) e processo de fixação em sulfato ferroso (SFF) e formalina neutra tamponada (FNT) (B) para análises anatômicas e histoquímicas.....	45
Figura 11 - Extrato seco (A) e soluções (B e C) do extrato bruto e frações de <i>P.</i> <i>marginatum</i> , para testes fitoquímicos.	51
Figura 12 - Ilustração da estrutura molecular das clorofilas A e B, com ênfase na diferença de seu substituinte R.....	55
Figura 13 - Soluções-padrão de ácido gálico para determinação da curva de calibração.....	56
Figura 14 - Curva de calibração do ácido gálico obtida por espectrofotometria em 760 nm utilizando concentrações de 3, 8 e 16 µg/mL.....	57
Figura 15 - Soluções-padrão de rutina.....	59
Figura 16 - Curva de calibração da rutina obtida através de espectrofotometria em 415 nm, em espectrofotômetro utilizando concentrações de 10, 20 e 30 µg/mL.....	59
Figura 17 - Soluções para a determinação do conteúdo total de fitoesteroides.....	61

Figura 18 - Curva de calibração do colesterol obtida através da espectrofotometria em 640 nm utilizando concentrações de 95, 173, 239, 295 e 343 µg/mL.....	62
Figura 19 - Cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE). Espectros de ultravioleta (UV) do padrão de vitexina nas cores azuis e rosa e das amostras nas cores verde, preta e vermelha (A), curva de calibração do padrão de vitexina (B) e cromatogramas das amostras (C)	63
Figura 20 - Folhas inteiras desenvolvidas e cortes foliares transversais e paradérmicos de <i>P. marginatum</i> para caracterizações macro, micromorfológica e histoquímica.....	67
Figura 21 - Resultados da inibição percentual e tamanho final de plântulas de <i>L. sativa</i> (alface) (A) e <i>A. cepa</i> (cebola) (B) submetidas ao extrato bruto e frações de <i>P. marginatum</i> (amostras e concentrações)	70
Figura 22 - Placas mostrando diminuição de tamanho das plântulas à medida que as concentrações de extrato bruto e frações foram aumentadas.....	70
Figura 23 - Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), comprimento total das plântulas (B), alongamento do hipocótilo das plântulas (C) e comprimento da radícula das plântulas de alface (D) submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações de <i>P. marginatum</i>	73
Figura 24 - Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), comprimento total das plântulas (B), alongamento do hipocótilo das plântulas (C) e comprimento da radícula das plântulas de cebola (D) submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações de <i>P. marginatum</i>	76
Figura 25 - Resultados obtidos no ensaio do poder redutor pelo método do fosfomolibdênio, expressos como média ± desvio padrão, de três amostras de extrato bruto (EB) e frações de <i>P. marginatum</i>	77
Figura 26 - Comparação entre estruturas químicas de uma molécula sintetizada a partir de <i>P. multiplinervium</i> efetiva contra <i>H. pylori</i> (A) e um composto análogo isolado de <i>P. marginatum</i> (B).	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns compostos isolados de espécies de <i>Piper</i>	22
Tabela 2 - Rendimentos em massa (g) e teores (%) do extrato bruto e frações das folhas frescas de <i>P. marginatum</i>	50
Tabela 3 - Total dos metabólitos analisados no extrato bruto e frações de <i>P. marginatum</i> (mg/g).	54
Tabela 4 - Resultado dos testes histoquímicos em folhas de <i>P. marginatum</i>	69
Tabela 5 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o EB e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de <i>P. marginatum</i> para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, comprimento total, comprimento do hipocótilo e comprimento da radícula das plântulas de alface.....	72
Tabela 6 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o EB e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de <i>P. marginatum</i> para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, comprimento total, comprimento do hipocótilo e comprimento da radícula das plântulas de cebola.....	75
Tabela 7 - Média dos halos (cm) de inibição bacteriana do EB e frações obtidas das folhas frescas de <i>P. marginatum</i> (apenas controle)	78

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

ANOVA	análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
BuOH	butanol
Car	carotenoides
CC	cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DP	desvio padrão
DMSO	dimetilsulfóxido
Δ OD	absorbância teórica
EB	extrato bruto
F	teste de comparação de variâncias
FA	fração acetato de etila
FC	fração clorofórmio
FH	fração hexano
FNT	formalina neutra tamponada
FR	fração remanescente
g	grama
HCl	ácido clorídrico
HPLC	high performance liquid chromatography
Hz	hertz
ICET	Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia
M	molar
m/m	massa/massa
mgAG/g	miligrama de ácido gálico por grama
MHz	mega-hertz
mL	mililitro
MOBOT	Missouri Botanical Garden
NADI	reagente de teste histoquímico para óleos essenciais e oleorresinas
NaClO	hipoclorito de sódio
NaHSO ₃	bissulfito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio

nm	nanômetro
OE	óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	probabilidade de significância
P.A.	para análise
PAS	reagente de Schiff / ácido periódico para polissacarídeos de cadeia longa
ppm	parte por milhão
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotação por minuto
SFF	sulfato ferroso para teste histoquímico
TAnt	conteúdo total de antocianidinas
TCar	conteúdo total de carotenoides
TCIA	conteúdo total de clorofila A
TCIB	conteúdo total de clorofila B
TFen	conteúdo total de fenólicos
TFet	conteúdo total de fitoesteróis
TMS	tetrametilsilano
TTan	conteúdo total de taninos
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UI/mL	Unidades internacionais por mililitro
UV	ultravioleta
β	beta
μg	micrograma
μL	microlitro
$^{\circ}\text{GL}$	grau Gay-Lussac

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm contribuído significativamente para o fornecimento de compostos biologicamente ativos. Os quais são fitoquímicos com potencial na descoberta de moléculas úteis para uso como antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes e aleloquímicos (LI *et al.*, 2010; KUMAR; PANDEY, 2013; CHAN; WONG, 2014; DA SILVA *et al.*, 2014; SUWITCHAYANON *et al.*, 2017). Por isso essas substâncias têm alto valor agregado e são alvos promissores na busca de alternativas para agentes terapêuticos, como novos fitoterápicos ou fármacos (ATANASOV *et al.*, 2015; MARQUES; LOPES, 2015; PATIL; JAIN 2019; SALEHI *et al.*, 2019), e em outras aplicações como cosméticos (ALMEDA *et al.*, 2015), agroquímicos (CHENG; CHENG, 2015; PEREIRA *et al.*, 2018) e alimentos (SANTOS *et al.*, 2014).

O avanço tecnológico nos estudos dos constituintes químicos tem embasado e elevado a fitoterapia, área de conhecimento que tem exigido maiores cuidados na aquisição e identificação botânica inequívoca da espécie envolvida, nas padronizações para qualidade do material botânico, bem como na aplicação de métodos e técnicas que visem identificar e caracterizar substâncias relacionadas à atividade da planta (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011).

A alelopatia é outra área de estudos que vem se beneficiando dos recentes avanços tecnológicos. Essa estuda processos biológicos realizados por plantas, ou outros microrganismos, que através de metabólitos secundários, denominados aleloquímicos, são capazes de interferir no desenvolvimento de organismos. O potencial alelopático conhecido de espécies botânicas dispõe de importantes contribuições na investigação de novos compostos (RICE, 1984; RIZVI; RIZVI, 1992; KRUSE *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que na elucidação de uma atividade alelopática podem estar envolvidos conhecimentos da espécie a ser estudada como localização geográfica, morfologia de seus órgãos e metabolismo (LI *et al.*, 2010), bem como o local específico de produção, caracterização química, interações bioquímicas e mecanismo de ação dos aleloquímicos identificados (RIZVI; RIZVI, 1992; CHOU, 2010).

Apesar do entendimento da dinâmica em alelopatia ser complexo, a interdisciplinaridade e o trabalho em grupo de pesquisa favorecem estudos mais

detalhados, e podem levar a uma relação coerente entre os resultados (MACÍAS, 2005). Nesse contexto, a alelopatia é uma área de estudos relevante para reforçar novas pesquisas.

Uma classe de metabólitos de grande interesse atualmente têm sido os compostos fenólicos, por demonstrarem muitas ações biológicas (KUMAR; PANDEY, 2013; TAMULY *et al.*, 2014). Diversas substâncias dessa classe ganham destaque, entre elas a flavona vitexina, com efeitos antihipertensivos, anti-inflamatórios, antitireoidianos, antiarterioscleróticos, antihepatotóxicos, anticâncer e antibacteriano (UGUSMAN *et al.*, 2012). A vitexina tem sido identificada em várias espécies de *Piper* e é potencialmente um dos marcadores do gênero.

A pesquisa brasileira, comparada a de outros países da América Latina, tem aumentado substancialmente seus esforços na descoberta de fontes de produtos naturais, tendo como base a enorme biodiversidade do país, e utilizando contribuições como os dados etnofarmacológicos (MARQUES; LOPES, 2015). Portanto é imperativo contribuir para as elucidações inerentes à morfoanatomia botânica, à fitoquímica de espécies e aos seus potenciais biológicos.

Portanto, este trabalho teve como objetivos descrever a morfoanatomia e histoquímica foliar, investigar o perfil fitoquímico, e os potenciais alelopático, antibacteriano e antioxidante do extrato de folhas de *Piper marginatum* Jacq., a fim de contribuir para a busca de alternativas em saúde como fitoterápicos, além de promover a descoberta de novos fármacos e/ou agroquímicos a partir de plantas.

Adicionalmente este trabalho pode fornecer parâmetros para a qualidade e segurança do uso de plantas medicinais por populações em vulnerabilidade social, como possível ferramenta nas estratégias de medicina tradicional (BRASIL, 2006) para os anos de 2014 – 2023, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2013).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Há registros históricos que remontam a milênios de uso de produtos naturais na terapêutica e outras necessidades humanas. Estudos mais recentes têm evidenciado um potencial notório no que tange à presença de substâncias bioativas, sendo a maioria dos compostos de origem vegetal (LAHLOU, 2013), principalmente presentes em extratos e óleos essenciais.

Entre os grupos de substâncias mais promissoras estão os compostos fenólicos e suas diversas atividades biológicas, relacionadas com distúrbios de saúde como os cardiovasculares e os degenerativos (KUMAR; PANDEY, 2013).

No fim da década de 1970 a OMS reconheceu que nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento cerca de 80% da população ainda dependia da medicina tradicional com plantas para suas necessidades primárias de saúde (WHO, 1978). A partir de então essa organização passou a promover a necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (ROSA *et al.*, 2011). Porém, estima-se que das 250.000 a 500.000 espécies de plantas superiores apenas 6% delas foi investigado quanto à suas atividades biológicas e 15% quanto aos seus constituintes químicos (AZADBAKHT *et al.*, 2017).

A medicina tradicional tem um papel importante em indicar as substâncias relevantes de uso terapêutico através de dados etnofarmacológicos (BRAZ FILHO, 2010; LAHLOU, 2013; ATANASOV *et al.*, 2015), e o volume de evidências experimentais tem contribuído para que países desenvolvidos se voltem para a fitoterapia (MARQUES; LOPES, 2015).

No Brasil, uma crescente demanda clínica em saúde básica, além de fatores como a redução de gastos com saúde pública, tem levado os governos, a comunidade científica, empresas e órgãos de controle sanitário a buscarem tratamentos alternativos e sustentáveis em saúde e bem estar humanos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; ANVISA, 2010a; 2010b; BARRETO, 2011; PERFEITO, 2012; MENDES, 2014; ANVISA, 2014).

Diante do exposto a indústria farmacêutica e a pesquisa clínica precisam de dados específicos e confiáveis que contribuam para um cenário mais favorável à pesquisa, produção e comercialização de fitoterápicos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; BRAZ FILHO, 2010; BARRETO, 2011; HASENCLEVER *et al.*, 2017).

Inúmeras espécies vegetais são alvos de estudos em todo o mundo e o gênero *Piper* tem sido amplamente investigado. *P. marginatum*, espécie presente na América do Sul, inclusive na Amazônia brasileira, é uma fonte promissora de fitoconstituintes, em razão de suas diversas atividades biológicas relatadas (AUTRAN *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2014; BAY-HURTADO *et al.*, 2016; CAMARA *et al.*, 2016; KRINSKI; FOERSTER, 2016). No entanto, não há estudos em alelopatia nesta espécie, nem dados morfoanatômicos, farmacognósticos e sobre a maioria dos seus potenciais biológicos.

2.1 Família Piperaceae e gênero *Piper* L.

Piperaceae compreende cerca de 3.700 espécies, distribuídas em cinco gêneros (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016), possuindo quatro gêneros principais (*Piper*, *Peperomia*, *Sarchorhachis* e *Otonia*) (BAY-HURTADO *et al.*, 2016). Piperaceae é pantropical e tem a América Latina como um centro da diversidade dessa família (YUNCKER, 1958). Ela é amplamente encontrada no Brasil (Figura 1) (BFG, 2015).

Figura 1 – Distribuição geográfica mundial de Piperaceae



Nota: Presença de Piperaceae: cores nas tonalidades variando de laranja a amarelo claro.

Fonte: Missouri Botanical Garden - MOBOT (2018).

Piper e *Peperomia* são os gêneros mais representativos de Piperaceae, com aproximadamente 2.000 e 1.700 espécies, respectivamente (JARAMILLO; MANOS, 2001; WANKE *et al.*, 2007; MATHEW *et al.*, 2017). Esses gêneros também são os mais diversificados nos biomas Mata Atlântica e Amazônia (BFG, 2015; MONTEIRO,

2018). *Piper* é o maior da família e possui alto número de espécies endêmicas na Amazônia brasileira (BFG, 2015; MONTEIRO, 2018).

Piper tem relatos de uso em todo o trópico como alimento, aromático, tempero, alucinógeno, e principalmente com fins terapêuticos (WADT *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2010). Suas espécies são vastamente utilizadas na medicina tradicional em males gastrointestinais e hepáticos, febre, dor de cabeça, diarreia, reumatismo, furúnculos, sarna, problemas estomacais, doenças respiratórias. Há registros ainda de serem diuréticas, antiparasitárias, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antivirais, hemostáticas, inseticidas, entre outras. (TSAI *et al.*, 2005; FELIPE *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2010; MOHAMAD *et al.*, 2011; CHAKRABORTY; SHAH, 2011; GOGOSZ *et al.*, 2012; SHARKAR *et al.*, 2013; UMOH *et al.*, 2013; SUWANPHAKDEE *et al.*, 2016; JARAMILLO-COLORADO *et al.*, 2016; MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017; YANG; CHEN, 2017).

Piper guineense Schum & Thonn é utilizada como remédio para tosse, bronquite, doenças venéreas, reumatismo, infertilidade feminina e afrodisíaco (PARMAR *et al.*, 1997; TEKWU *et al.*, 2012; UMOH *et al.*, 2013). A decocção das raízes de *Piper chaba* Hunter é usada para alívio da sensação de dor em dispepsia e gastralgia, e as raízes também são úteis na asma e bronquite (NAZ *et al.*, 2012).

Piper tuberculatum Jacq. é usada como analgésico, sedativo, antídoto para picadas de cobra e tratamento de distúrbios digestivos (CHAVES *et al.*, 2003; FELIPE *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2015). *Piper angustifolium* Lam. é usada no tratamento de lesões associadas à leishmaniose cutânea, estomatite, vaginite, erisipela, distúrbios hepáticos e antisséptico (BOSQUIROLI *et al.*, 2015).

Os óleos de *Piper hispidum* Sw., *Piper aleyreanum* C. DC. e *Piper anonifolium* Kunth, estudados por Da Silva *et al.* (2014), indicaram potente atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

O extrato de folhas de *Piper betel* da Índia, estudada por Barh *et al.* (2013), contém atividades como antimicrobiana, antileishmanial, antimalárica, antifilarial, antifúngica, antialérgica, imunomoduladores, gastroprotetores, antioxidantes e agentes anti-inflamatórios.

Diversas espécies de *Piper* tem sido amplamente investigadas como fonte de novos produtos naturais, evidenciando potenciais como antifúngico, antitumoral, antioxidante, propriedades antiplasmódicas, tripanocidas (LAGO *et al.*, 2009; Da SILVA *et al.*, 2014; MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017), entre outros. Esses registros

disponíveis indicam que as propriedades biológicas das substâncias químicas presentes nessas espécies têm potenciais de aplicações farmacológicas (KATO; FURLAN, 2007).

Muitas espécies de *Piper* também tem importância econômica, principalmente devido à presença de conteúdo oleífero em suas estruturas, a exemplo das *Piper crassinervium* H.B. & K., *Piper hispidinervum* C.DC., *Piper aduncum* L., *Piper nigrum*, entre outras (GOGOSZ *et al.*, 2012). Devido à produção de safrol, *P. hispidinervum*, encontrada na Amazônia, tem relevante valor comercial (NEGREIROS *et al.*, 2015).

2.2 Metabólitos secundários de *Piper* e suas atividades biológicas

Estima-se que até 2004 apenas 10% das espécies de *Piper* foram estudadas fitoquimicamente (SANTOS, 2014). Os compostos bioativos das espécies de *Piper* desempenham um papel importante como agentes terapêuticos na descoberta de drogas (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

Piper tem relatados alcaloides/amidas, lignanas, flavonoides, neolignanas, alilfenóis, esteroides, pironas, terpenos, chalconase, dentre outros (Tabela 1). Relatos demonstraram que existem conhecidos quase 700 compostos. Seus constituintes isolados indicaram atividades biológicas como antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória, anticancerígena, antileishmanial, hepatoprotetora, gastroprotetora, antioxidante, antimalárica, antifilarial, antifúngica, antialérgica, imunomoduladora, acaricida, entre outras (BARH *et al.* 2013; SANTOS *et al.*, 2014; BAY-HURTADO *et al.*, 2016; CAMARA *et al.*, 2016; BASTOS *et al.*, 2018).

A maioria dos compostos identificados de espécies de *Piper* é oriunda de óleos essenciais, de onde se pode citar lignanas, fenilpropanoides e sesquiterpenos (FACUNDO *et al.*, 2008). Embora entre a minoria haja registros de relevantes constituintes, como os flavonoides obtidos de extrato de folhas e outras partes vegetais (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

Entre os fenilpropanoides há ocorrência do safrol (4-alil1,2-metilenodioxibenzeno) no óleo essencial de *Piper hispidinervium* (CREMASCO; BRAGA, 2010), que tem demonstrado atividades como antimicrobiana, antioxidante e antineoplásica (Tabela 1).

As espécies de *Piper* também têm registros de atividade antifúngica, anticancerígena e antiparasitária. Essas propriedades foram associadas a um dos compostos mais extensivamente estudados e isolados no gênero, a piperlongumina, também conhecida como piplartina (BEZERRA *et al.*, 2015).

Tabela 1 – Alguns compostos isolados de espécies de *Piper*

Classe	Composto	Atividade	Ocorrência	Referências
	Piperolactama	Citotóxica	<i>P. acutisleginum</i> <i>P. arborens</i> <i>P. argyrophyllum</i> <i>P. boehmeriaefolium</i> <i>var. tonkinense</i> <i>P. marginatum*</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. scutifolium</i> <i>P. taiwanense</i> <i>P. umbellatum</i>	(Olsen <i>et al.</i> , 1993; Singh <i>et al.</i> , 1996; Chen <i>et al.</i> , 2004; Xiao <i>et al.</i> , 2005; Chaves <i>et al.</i> , 2006; Marques <i>et al.</i> , 2007; Ee <i>et al.</i> , 2008; Tabopda <i>et al.</i> , 2008)
Alcaloides	Stigmalactama	Citotóxica	<i>P. boehmeriaefolium</i>	(Xiao <i>et al.</i> , 2005)
	Cefaradiona A	Citotóxica Danificação de ADN	<i>P. argyrophyllum</i> <i>P. lolot</i> <i>P. caninum</i>	(Gupta <i>et al.</i> , 1999; Ma <i>et al.</i> , 2004b; Li <i>et al.</i> , 2007)
	Dímero de Piplartina A	Citotóxica	<i>P. arborescens</i> <i>P. rugosum</i> <i>P. tuberculatum</i> <i>P. puberullum</i>	(Filho <i>et al.</i> , 1981; Duh <i>et al.</i> , 1990; Maxwell e Rampersad, 1991; Lee <i>et al.</i> , 2004; Marques, 2009; Lago, Ito <i>et al.</i> , 2012)
	Chavicine	Intensificador de memória	<i>P. nigrum</i>	(Xin <i>et al.</i> , 2016; Iqbal <i>et al.</i> , 2016)
	Dilapiol	Inseticida Antimicrobiano	<i>P. aduncum</i> <i>P. obriquum</i> <i>P. hispidinervum</i> <i>P. marginatum*</i> <i>P. regnellii</i>	(Ramos <i>et al.</i> , 1986; Orjala <i>et al.</i> , 1993; Benevides <i>et al.</i> , 1999; Estrela <i>et al.</i> , 2006; Rafael <i>et al.</i> , 2008; Guerrini <i>et al.</i> , 2009)
Fenilpropanoides	Elemicina	Antimicrobiana	<i>P. bankisii</i> <i>P. futokadsura</i> <i>P. guineense</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>P. marginatum*</i> <i>P. nigrum</i>	(Loder e Neam, 1972; Ramos <i>et al.</i> , 1986; Ekundayo <i>et al.</i> , 1988; Mundina <i>et al.</i> , 2001; Jirovetz <i>et al.</i> , 2002; Konishi <i>et al.</i> , 2009)
	Safrol	Antimicrobiana Antioxidante Antineoplásica	<i>P. cubeta</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. retractorum</i> <i>P. aduncum</i>	(Banerji e Dhara, 1974; Bodiwala <i>et al.</i> , 2007; Marques,

(Continua)

(Conclusão)

			<i>P. auritum</i> <i>P. betle</i> <i>P. guineese</i> <i>P. hispidinervi</i> <i>P. marginatum*</i> <i>P. obliquum</i>	2009; Cremasco e Braga, 2010)
Terpenos	Limonemo	Antifúngica Antibacteriano	<i>P. nigrum</i>	(Musenga; Madrioli <i>et al.</i> , 2007)
	α -pinemo / β - pinemo	Antifúngica Antibacteriano	<i>P. nigrum</i>	(Musenga; Madrioli <i>et al.</i> , 2007)
Lignanas e neolignanas	Sesamina	Antituberculose Antioxidante Nefroprotetora Antileishmania Antihipertensivo	<i>P. cubeba</i> <i>P. refractorum</i> <i>P. sylvaticum</i>	(Marques, 2009; Pamar e Jain, 1997)
	(-) - grandisina	Tripanomicida Larvicida Inseticida	<i>P. solmsianum</i>	(Leite <i>et al.</i> , 2012; Marques, 2009)
	(-) - cubebina	Antifúngica Antihistamínica Anti-inflamatória Tripanomicida Antineoplásica	<i>P. cernuum</i> <i>P. clusii</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. trichostachyon</i>	(Marques, 2009; Niwa <i>et al.</i> , 2013)
Chalcona / Dihidrochalcona / Flavonoide	Flavokavaina B	Antifúngica Leishmanicida Citotóxica	<i>P. dilatatum</i> <i>P. rusbui</i> <i>P. methylsticum</i>	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2013; Flores <i>et al.</i> , 2007)
	Adunchalcona	Leishmanicida	<i>P. aduncum</i>	(Dal Picolo <i>et al.</i> , 2014)
	Vitexina	NI	<i>P. marginatum*</i>	(Tillequin <i>et al.</i> , 1978)
	Marginatosideo	NI	<i>P. marginatum*</i>	(Tillequin <i>et al.</i> , 1978)
Esteroides	Estigmasterol	Antifúngica	<i>P. chimonantifolium</i> <i>P. renitens</i> <i>P. dilatatum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2012; Facundo <i>et al.</i> , 2012)
	Sitosterol	Antifúngica	<i>P. chimonantifolium</i> <i>P. renitens</i> <i>P. dilatatum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2012; Facundo <i>et al.</i> , 2012)

Nota: * grifo do autor (2018); NI: não informada.

Fonte: Adaptado de Fokoue (2014), Guzman e Brú (2016) e Mgbeahurike *et al.* (2017).

O óleo essencial extraído de folhas, rico em sesquiterpeno nerolidol, isolado de *Piper claussonianum* (Miq.) C. DC foi efetivo na redução de crescimento de *Candida albicans* (CURVELO *et al.*, 2014). Amidas isoladas de extratos de sementes e folhas de *P. tuberculatum* evidenciaram potente atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides* (NAVICKIENE *et al.*, 2000, 2003; VASQUES *et al.*, 2002). O extrato bruto e o composto piplartina de raízes dessa mesma espécie demonstraram eficácia anticancerígena *in vitro* e *in*

vivo (BEZERRA *et al.*, 2015), bem como o ácido propanóico também apresentou atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* (FELIPE *et al.*, 2007). Os óleos essenciais de *P. aduncum* L. também tem sido estudadas como opções terapêuticas contra parasitas (BOSQUIROLI *et al.*, 2015.)

Atividades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias dos extratos de espécies de *Piper* têm sido amplamente relatadas (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017). Em *Piper porphyrophyllum* NE Br., a 3',4',5,7-tetrametoxiflavona apresentou atividade antibacteriana e 4',5-dihidroxi-3',7-dimetoxiflavona elevada atividade anti-inflamatória. *Piper multiplinervium*, pertencente filogeneticamente ao complexo *P. marginatum*, possui molécula isolada e sintetizada efetiva contra *Helicobacter pylori* (Figura 24A) (RÜEGG *et al.*, 2006; MALAMI *et al.*, 2014).

Além da atividade anticancerígena atribuída à presença de numerosos piperamídeos (BEZERRA *et al.*, 2006; GONG *et al.*, 2014), há relatos de atividades antineoplásica e anticolinesterásica associada à (-)-cubebina, encontrada em várias espécies de *Piper* (Tabela 1), como a *Piper cubeba* L. f. Vale ressaltar que foi observado que as ações anticolinesterásicas de *P. anonifolium* e *P. hispidum* foram cem vezes mais potentes que o padrão fisostigmina.

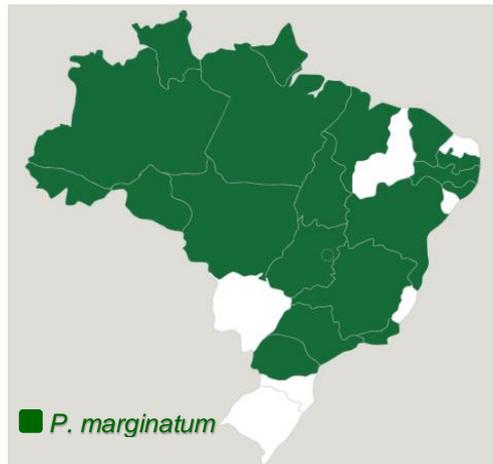
O óleo de *Piper aleyreanum* evidenciou alta atividade citotóxica *in vitro* contra a linha celular de melanoma humano SKMEL-19 (Da SILVA *et al.*, 2014).

A Tabela 1 mostra outros exemplos de compostos de *Piper* e suas respectivas atividades.

2.3 *Piper marginatum* Jacq.

P. marginatum é uma espécie neotropical distribuída na América Central e em toda a América do Sul, incluindo fragmentos da Mata Atlântica, nordeste do Brasil (CAMARA *et al.*, 2016; GUZMAN; BRÚ, 2016) e Amazônia (BAY-HURTADO *et al.*, 2016; KRINSKI; FOERSTER, 2016), e está presente em 20 dos 26 estados do Brasil (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição geográfica de *P. marginatum* por estado do Brasil



Fonte: Adaptado de Guimarães (2015).

A espécie *P. marginatum* Jacq. foi descrita pela primeira vez em 1781 pelo botânico holandês Nikolaus Joseph von Jacquin (GUZMAN; BRÚ, 2016). Consiste em um arbusto que pode atingir até cinco metros de altura (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004), exibindo uma folha em forma de coração e um pecíolo alado característico, dois marcos vegetativos para rápida identificação (Figura 3) (GUZMAN; BRÚ, 2016). Na América Central ela é conhecida como “Aniseto”, “curadientes e cordoncillo” na Colômbia, “Ti bombe” na Guiana Francesa, “lanie bois” em Trinidad e Tobago, e no Brasil como capeba, caapeba cheirosa, capeba-mansa, malvarisco, pimenta do mato, entre outros (SEQUEDA-CASTAÑEDA *et al.*, 2015; BAY-HURTADO *et al.*, 2016; GUZMAN; BRÚ, 2016).

Figura 3 - *P. marginatum* em campo de coleta, cidade de Itacoatiara, Amazonas – Brasil (3° 08' 47.3" S 58° 26' 56.2" W)



Fonte: Nunes (2017).

Na medicina popular *P. marginatum* é utilizada principalmente contra distúrbios gástricos, e ainda como antiespasmódico, diurético, estimulante, no alívio de doenças de fígado, intestino e vesícula biliar, reumatismo, dores, tosse, pressão arterial alta, asma, erisipela, problemas no sistema urinário, entre outros (BAY-HURTADO *et al.*, 2016; FERREIRA, 2016; GUZMAN; BRÚ, 2016).

A decocção de folhas de *P. marginatum* é utilizada pelos nativos da Amazônia contra doenças do fígado e vesículas e como tônica com ação carminativa e antiespasmódica (VAN DEN BERG, 1982; REIGADA *et al.*, 2007). Na área rural da cidade deste estudo, Itacoatiara-AM, povos tradicionais denominados ribeirinhos, estudados por Ferreira (2016), usam a folha de *P. marginatum* para dores estomacais.

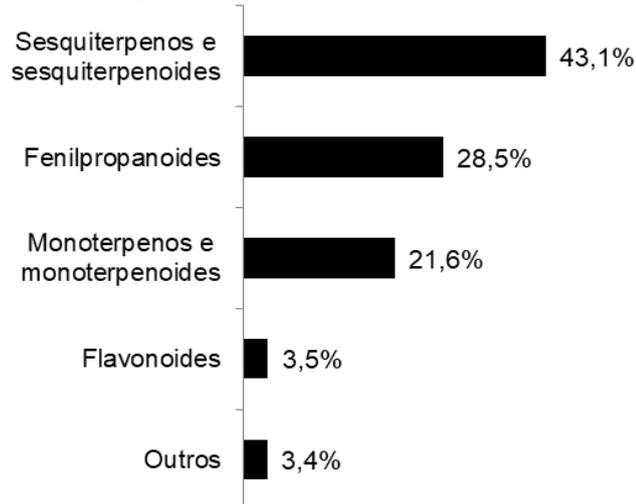
Principalmente a partir da década de 1970 têm sido identificados diversos compostos em *P. marginatum*. Há registro de isolamento de fenilpropanoides de raízes em exemplares do nordeste brasileiro (SANTOS *et al.*, 1998). Na pesquisa de Ramos *et al.* (1986), realizada com óleo essencial de folhas, coletadas na estação seca no município deste estudo (Itacoatiara-Amazonas-Brasil), foram identificados o dilapiol, safrol, arilpropanoides, muitos monoterpenoides e sesquiterpenoides. Em estudo com exemplar da espécie da Guiana Francesa, foram isolados os flavonoides vitexina e marginosídeo de extratos butanólicos (BuOH) (TILLEQUIN *et al.*, 1978).

A maioria dos estudos fitoquímicos de *P. marginatum* concentrou-se no óleo essencial da planta. De 132 compostos identificados, em óleos essenciais e extratos de várias partes vegetais, 116 são oriundos de prospecção em folhas, e foram identificados majoritariamente sesquiterpenos e sesquiterpenoides (43,1%), fenilpropanoides (28,5%) e monoterpenos e monoterpenoides (21,6%). Um grupo a ser considerado foi o de flavonoides (3,5%) (Figura 4). Entre todos os metabólitos secundários identificados nessa revisão somente cinco foram testados quanto à atividade biológica (GUZMAN; BRÚ, 2016).

Quanto às propriedades biológicas e farmacológicas de *P. marginatum*, a maioria dos estudos também se concentrou em óleo essencial. Importantes achados como potencial antibacteriano, antifúngico e larvicida são destaques. O óleo essencial foliar inibiu o crescimento da bactéria *Escherichia coli* com uma concentração inibitória mínima (CIM) entre 700 e 900 µg/mL contra duas cepas patogênicas, STEC0157 e EPEC0312, respectivamente. Uma CIM de 120 µg/mL foi encontrada contra a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas albilineans*. O óleo

essencial também inibiu os fungos fitopatogênicos *Alternaria solanii* Sor e *Fusarium oxysporum* (SCHLECHT), exibindo atividade moderada em ensaios de difusão em disco (Dos SANTOS, 2011; GUZMAN; BRÚ, 2016).

Figura 4 – Porcentagem por classes de metabólitos considerando 116 fitoquímicos identificados de folha de *P. marginatum*



Fonte: Nunes (2018), adaptado de Guzman e Brú (2016).

Os extratos etanólicos e frações de *P. marginatum* Jacq. apresentaram alta atividade antibacteriana diante de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), bactérias associadas à periodontite crônica (GAMBOA *et al.*, 2018).

P. marginatum também possui potencial na agricultura. Como fungicida, uma fração purificada reduziu o crescimento de *Colletotrichum scovillei*, um fungo responsável pela antracnose do pimentão, tanto *in vitro* como em pós-colheita, de modo mais eficiente do que o fungicida mancozeb (ARAÚJO *et al.*, 2014). Adicionalmente, *in vitro* e *in vivo*, foi observado efeito do extrato de *P. marginatum* sobre a esporulação e a germinação do fitopatógeno *Corynespora cassicola* em mudas de tomate (Da COSTA, 2018).

Há relatos de outras atividades como antioxidante (BAY-HURTADO *et al.*, 2016) e larvicida de *Aedes aegypti* (AUTRAN *et al.*, 2009). Os óleos das folhas de *P. marginatum* se destacaram de outras *Piper* apresentando atividade ovicida (fitoinseticida) frente a ninfas do percevejo-do-colmo, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae) (KRINSKI; FOERSTER, 2016).

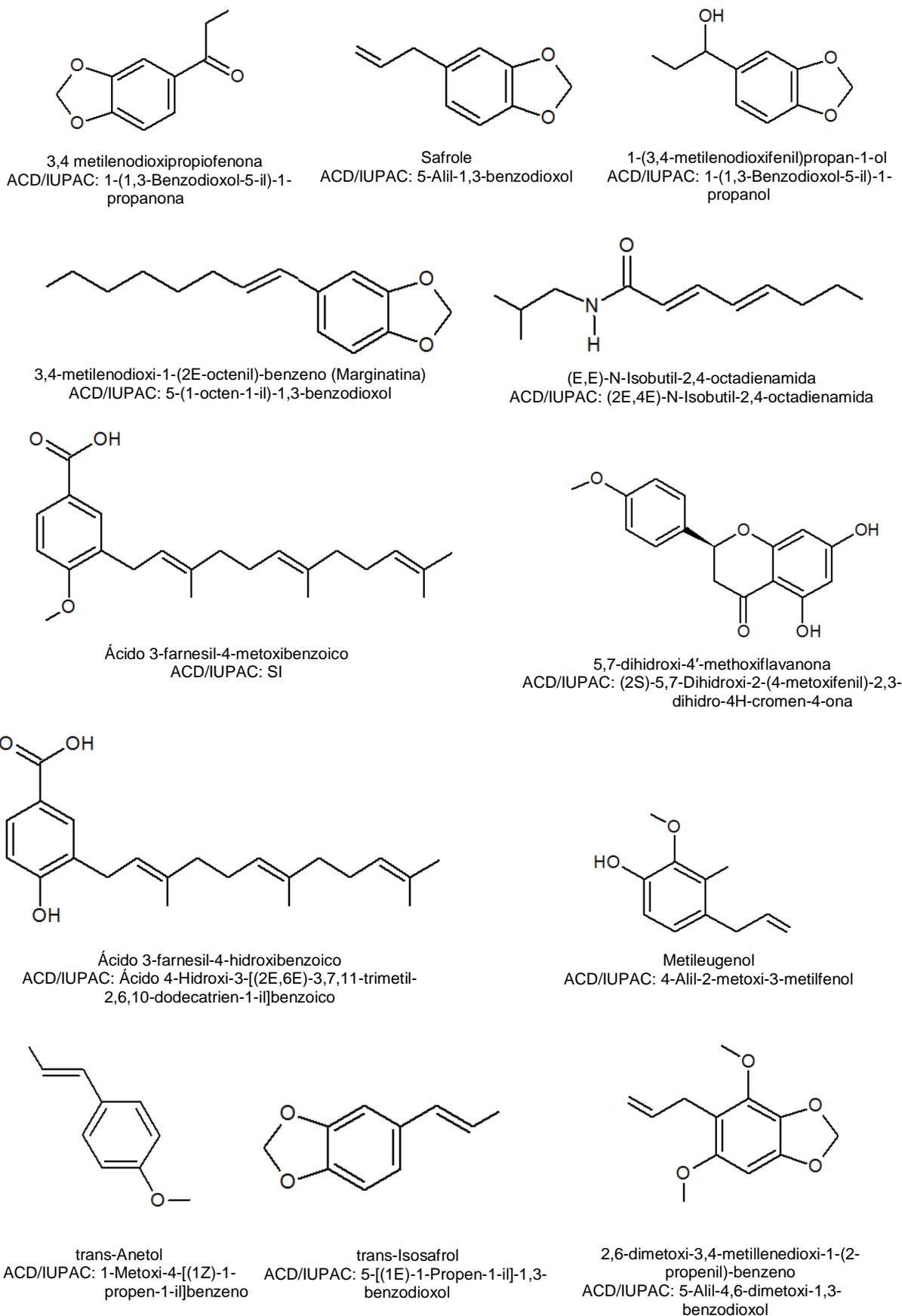
Embora exista literatura sobre o potencial terapêutico e agrônômico do óleo essencial e extrato das partes aéreas de *P. marginatum*, não há registros sobre os estudos alelopáticos do extrato desta espécie.

2.3.1 Estrutura química de alguns compostos de *P. marginatum* já identificados

A espécie *P. marginatum* possui uma fitoquímica peculiar, com a presença de metabólitos secundários específicos não identificados em outras espécies de *Piper*, como o anetol, estragol, isoeugenol metil éter, os fenilpropanoides ácidos 3-farnesil-4-hidroxibenzóico e 3-farnesil-4-metoxibenzóico, e os glicosídeos marginatosídeo e vitexina, conforme relata Parmar *et al.* (1997) (Figura 6).

Muitos outros compostos têm sido identificados em *P. marginatum* (SEQUEDA-CASTAÑEDA *et al.*, 2015); GUZMAN; BRÚ, 2016) (Figura 5).

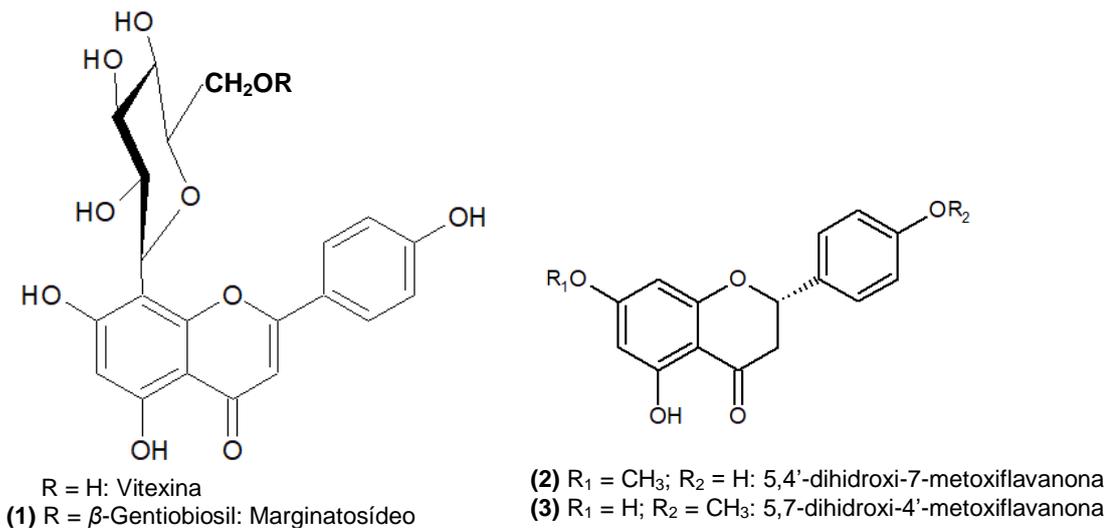
Figura 5 – Estrutura química de alguns compostos de *P. marginatum* já identificados



Nota: SI: sem informação; ACD: Advanced Chemistry Development, Inc. / IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Fonte: Sequeda-Castañeda *et al.* (2015) e Guzman e Brú (2016).

Figura 6 – Estrutura química de três compostos (1, 2 e 3) identificados apenas em *P. marginatum*



Fonte: Tillequin *et al.* (1978) e Guzman e Brú (2016).

2.4 Estudos morfoanatómicos e histoquímicos

As plantas produzem diversos tipos de secreções, constituídas por metabólitos primários (proteínas, polissacarídeos e pectinas) ou secundários como terpenoides, fenólicos e alcaloides. Esses compostos estão envolvidos em diversos processos que garantem a existência e manutenção das plantas e, por vezes, podem alterar o metabolismo de outros organismos (CUTTER, 2002; DORES, 2007).

A folha é um órgão vegetal de muito interesse, pois nela há intenso metabolismo, e esta está associada à produção e armazenamento de muitos compostos de interesse em áreas como a botânica, no auxílio à taxonomia de espécies, além da fitoquímica, medicina e agricultura (CARVALHO; RIBEIRO, 2005).

Porém o uso errado ou por adulteração de partes vegetais é algo comum e que pode gerar sérios problemas, dependendo do fim a que se destina. Vale salientar que no Brasil há o grave e comum problema dos fitoterápicos substituídos por plantas alternativas ou adulteradas. Isso com a agravação pela não exigência de que o mercado consumidor publique monografias oficiais para controle de qualidade (SALATINO; SILVA, 1975; PESSINI *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2015).

Considerando tal contexto e a complexidade de identificação de espécies de *Piper*, uma vez que estas são bastante similares tanto morfológica quanto anatomicamente (JARAMILLO *et al.*, 2008), há a necessidade de se fazer estudos morfoanatómicos e histoquímicos a fim de fornecer suporte à taxonomia. E assim

permitir a identificação correta dessas espécies, dado o potencial medicinal e farmacológico de seus constituintes químicos (ALBIERO *et al.*, 2005b).

Portanto, os estudos em morfoanatomia e histoquímica foliar de *P. marginatum* podem contribuir com a taxonomia das espécies de *Piper* (GOGOSZ *et al.*, 2012).

As análises botânicas podem também direcionar e indicar os órgãos ou parte foliar onde há maior produção de alguns metabólitos já descritos na literatura (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

2.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (MINATEL *et al.*, 2017; MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

Há indicação que os fenólicos são responsáveis pela adaptação vegetal e resistência a fatores ambientais adversos. Eles conferem às plantas uma alta resistência a microrganismos (ROCHA *et al.*, 2011).

Os fenólicos estão estreitamente relacionados com diversas ações biológicas descritas. Eles têm sido amplamente revisados e relatados como tendo efeitos na saúde humana, principalmente por sua propriedade antioxidante, em geral associada a mecanismos de diminuição do estresse oxidativo nos organismos (BEER *et al.*, 2002; MINATEL *et al.*, 2017), e por estarem relacionados a outras atividades como anti-inflamatória (HEREDIA *et al.*, 2016), anticancerígena, antimicrobiana, entre outras. Suas propriedades bactericidas e antioxidantes possivelmente protegem os consumidores de vinho de doenças cardiovasculares de região francesa (BEER *et al.*, 2002; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Compostos fenólicos foram identificados em *Piper auritum* (CONDE-HERNÁNDEZ *et al.*, 2014), *Piper betle* (HWANG *et al.*, 1992), *Piper carniconnectivum* C.DC. (ALVES *et al.*, 2010), *Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz (TAMULY *et al.*, 2014), *Piper methysticum* (XUAN *et al.*, 2008), *Piper glandulosissimum* Yuncker (SANTOS *et al.*, 2015), entre outras. *P. nigrum* foi considerada com alto teor de fenólicos (ZARAI *et al.* 2013).

Fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos e lignanas estão presentes nas espécies de *Piper* (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017). Também há relatos de ácidos fenólicos como o ácido vanílico, cafeico, ferúlico, protocatecoico e rosmarínico (CHANDRA *et al.*, 2015).

Entre os fenólicos mais estudados estão os flavonoides, que são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias. Estão amplamente presentes na maioria das plantas, e participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e defesa dos vegetais (DORNAS *et al.*, 2007).

Há registro de flavonoides isolados em *P. marginatum* (GUZMAN; BRÚ, 2016), duas flavanonas, a 5,4'-di-hidroxi-7-metoxiflavanona e a 5,7-di-hidroxi-4'-metoxiflavanona, e dois flavonoides glicosilados, marginatosídeo e sua vitexina (TILLEQUIN *et al.*, 1978; REIGADA *et al.*, 2007) (Figura 6).

2.6 Potencial alelopático

A alelopatia é um fenômeno biológico comum pelo qual um organismo produz bioquímicos que influenciam o crescimento, sobrevivência, desenvolvimento e reprodução de outros organismos (CHENG; CHENG, 2015).

Os estresses e/ou danos podem ativar rotas biossintéticas e fazer com que a planta produza fitoconstituintes de proteção, como metabólitos secundários específicos. É conhecido que a atividade antibacteriana induz a produção de fenilpropanoides como uma resposta química da planta. Possivelmente conhecer esses constituintes conduz a uma triagem até serem reconhecidos como aleloquímicos, envolvidos em processos mais complexos e de interação positiva ou negativa de uma espécie com outros organismos ao seu redor (MORAES, 2014).

O estudo em alelopatia aumentou na década de 1970 e teve um rápido desenvolvimento desde meados da década de 1990, tornando-se popular na botânica, ecologia, agronomia, ciência do solo, horticultura e outras áreas de investigação em anos recentes. A interação alelopática pode ser um dos fatores significativos que contribuem para a distribuição e abundância das espécies nas comunidades vegetais (CHOU, 1999; CHENG; CHENG, 2015; ZHENG *et al.*, 2015).

Reconhece-se que os aleloquímicos, denominação das substâncias em alelopatia, podem ser liberados pelas plantas através de exsudação radicular,

lixiviação, volatilização e decomposição de seus resíduos, tanto naturalmente quanto em sistemas agrícolas (MACÍAS *et al.*, 2005).

No demais, o que se tem hoje sobre alelopatia indica que ela é uma área de estudo de potencial pouco inexplorado, e que no futuro pode ser usada para fins tão diversos como otimizar processos industriais ou tratar doenças. A maioria das ações e/ou interações desta área da ciência são desconhecidas e inexploradas em todas as suas potencialidades e aplicações (MACÍAS *et al.*, 2005).

Há registros de *Piper* com significativos efeitos alelopáticos (LUSTOSA *et al.*, 2007; BORELLA *et al.*, 2012).

2.6.1 Alface (*Lactuca sativa* L.) e cebola (*Allium cepa* L.) como plantas-teste

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários é uma característica espécie-específica, existindo aquelas mais sensíveis como *Lactuca sativa* L. (alface), uma dicotiledônea considerada planta indicadora de atividade alelopática. Essa espécie possui propriedades de uma espécie adequada ao teste, que deve apresentar germinação rápida e uniforme, além de ter grau de sensibilidade capaz de mensurar os resultados sob baixas concentrações de aleloquímicos (GABOR; VEATCH, 1981; RICE, 1984; FERREIRA; ÁQUILA, 2000 apud ALVES, 2004). Repolho (*Brassica oleracea* L. cv. *capitata*) e nabo (*Brassica rapa* L.) também são utilizadas como plantas-teste. Estudo detectou que a alface e o nabo são mais sensíveis se comparadas a outras espécies (RABÊLO *et al.*, 2008). Em estudos de Iganci *et al.* (2006), a cebola (*Allium cepa* L.) respondeu de maneira semelhante a alface, por isso, este trabalho complementou os ensaios utilizando cebola, uma monocotiledônea.

2.7 Potencial antimicrobiano

Atualmente as doenças infecciosas continuam sendo causa significativa de morte em todo o mundo, e os antibióticos não são ativos contra todos os microrganismos. Há ainda a realidade latente da resistência de muitos microrganismos aos antibióticos existentes. Por isso pesquisas têm buscado alternativas efetivas diante de uma clínica cada vez mais exigente (SANTOS *et al.*, 2014).

As plantas sempre foram fontes promissoras de antimicrobianos, todavia apenas nos últimos 30 anos esta atividade tem sido confirmada. Já em 2013 existia registrado no mundo mais de 1.340 plantas descritas com atividade antimicrobiana (IBRAHIM *et al.*, 2013).

A eficiência antimicrobiana dos fitoquímicos depende da estrutura química, dos grupos funcionais e seus substituintes, da estereoquímica e da concentração em que se encontra em uma espécie. Diversas classes químicas são conhecidas por sua atividade antimicrobiana como flavonoides, saponinas, tiosulfonato, glucosinolato, ácidos orgânicos e relevantemente os compostos fenólicos (IBRAHIM *et al.*, 2013).

Os estudos de *P. marginatum* podem fornecer base para novos fármacos ou análogos. Pois além de haver relatos sobre compostos identificados e comprovados como antimicrobianos em espécies de *Piper* (ARAÚJO *et al.*, 2014; MALAMI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014), há estudos que demonstraram atividade antibacteriana e antifúngica de *P. marginatum* (SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a morfoanatomia foliar, o perfil fitoquímico, o potencial alelopático e caracteres farmacognósticos preliminares de *P. marginatum* Jacq. (Piperaceae), de Itacoatiara, médio Rio Amazonas.

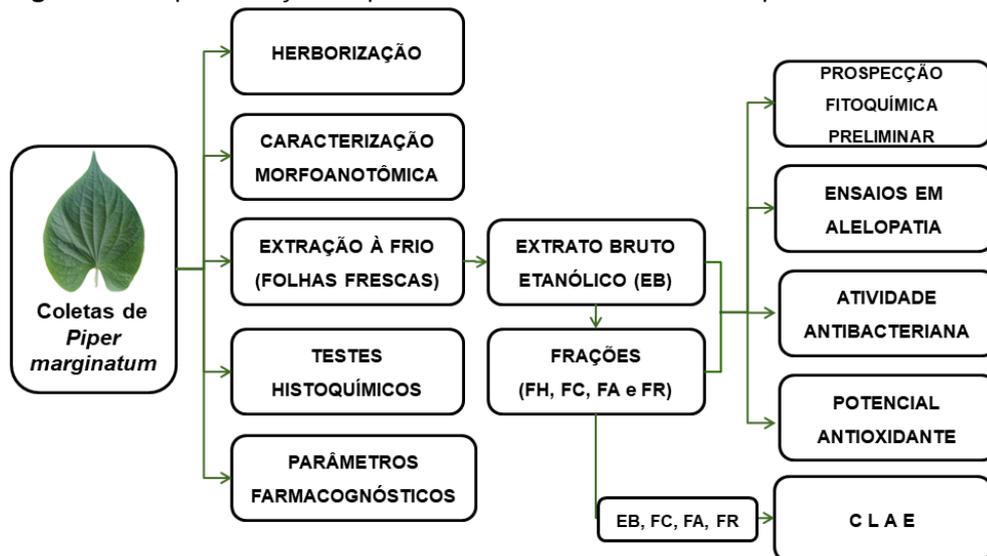
3.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudo morfoanatômico e histoquímico foliar em *P. marginatum*;
- Determinar os teores de água, umidade e cinza das folhas frescas de *P. marginatum*;
- Quantificar o teor de sólidos e rendimento do extrato bruto e frações;
- Investigar a composição química do extrato bruto e frações, bem como quantificar as classes de metabólitos secundários majoritários presentes nas amostras de extrato e frações por radiação ultravioleta (UV) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Analisar o potencial antioxidante frente ao complexo fosfomolibdênio;
- Verificar os efeitos alelopáticos do extrato bruto e frações sobre as sementes de *L. sativa* e *A. cepa* por bioensaios de germinação e crescimento;
- Verificar a atividade antibacteriana do extrato bruto e frações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho descreve a investigação do perfil fitoquímico do extrato bruto e frações, das folhas de *P. marginatum*, e dos potenciais alelopático, antibacteriano e antioxidante, e de caracteres farmacognósticos das referidas amostras, conforme ilustra a Figura 7.

Figura 7 – Representação esquemática do desenvolvimento experimental



Nota: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; CLAE: cromatografia à líquido de alta eficiência.

Fonte: Nunes (2019).

4.1 Coleta das folhas para obtenção do extrato bruto e frações

As folhas de *P. marginatum* foram coletadas no mês de julho de 2017, em terreno da Feira do Produtor (3° 08' 47.3" S, 58° 26' 56.2" W), na cidade de Itacoatiara, Amazonas, Brasil.

4.2 Reagentes, solventes e equipamentos

Os reagentes e solventes utilizados foram de pureza analítica (graus P.A. e HPLC) das marcas Merck, Sigma e Vetec, usuais em fitoquímica. O etanol comercial (96°GL) foi empregado para a obtenção do extrato bruto.

Para a preparação da excicata do material botânico foi utilizada a estufa de secagem marca Deleo, modelo A6SEDT.

Nas análises de potencial alelopático foi utilizada a câmara de capela de exaustão de fibra de vidro adaptada e escura, com relógio de fotoperíodo.

As análises de determinação e quantificação dos metabólitos presentes no extrato bruto e frações foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 e espectrofotômetro de varredura Shimadzu modelo UV-1601, cromatógrafo à líquido de alta eficiência (CLAE-UV) tipo detector de ultravioleta, Varian® modelo Pro Star, coluna C18 fase reversa - da Central Analítica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná - UFPR. Para as análises morfoanatômicas e histoquímicas foi utilizado microscópio óptico Leica DM500 do Laboratório de Biologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

4.3 Coleta das folhas de *P. marginatum* para herborização e fixação

O material botânico foi coletado para a herborização, estudos morfoanatômicos e histoquímicos. Duplicata desse material foi encaminhada para especialista do grupo de pesquisa para devida confirmação da identificação. Uma exsicata foi confeccionada para a inserção em uma coleção indexada no HERBIT (Herbário do Centro de Estudos Superiores de Itacoatiara – CESIT), da Universidade Estadual do Amazonas – UEA, sob o registro de nº 0034 (Figura 8).

Figura 8 – Exsicata de *P. marginatum*



Fonte: Adaptado de HERBIT (Herbário do Centro de Estudos Superiores de Itacoatiara – CESIT) (2019).

A caracterização morfoanatômica foi realizada com folha desenvolvida completamente expandida, e foi adotada a classificação de Hickey (1974) para analisar a morfologia foliar externa.

4.4 Obtenção do extrato bruto e frações

As folhas frescas de *P. marginatum* foram fragmentadas com tesoura. A massa dos fragmentos foi pesada e submetida à maceração a frio com etanol 96°GL, durante 10 dias contínuos, em repouso e temperatura ambiente.

O líquido extrativo foi separado e submetido à evaporação completa do solvente em banho-maria entre 55 a 60°C, para originar o extrato etanólico bruto, aqui denominado EB.

O método de particionamento do EB utilizado foi o sólido-líquido, com três lavagens sequenciais de 50 mL de solvente por lavagem, em ordem crescente de polaridade. A primeira fração a ser processada foi a hexano. Em seguida o material sólido resultante do primeiro processamento foi solubilizado em clorofórmio. Repetiu-se o processo com acetato de etila. O sólido resultante foi ressolubilizado em etanol 96°GL. As frações e suas respectivas codificações foram: hexano (FH), clorofórmio (FC), acetato de etila (FA), e o remanescente (FR). Todas as massas foram determinadas para os cálculos de rendimento (Equações 1 e 2).

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{teor de sólidos (g)}}{\text{massa do material fresco (g)}} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{massa da fração (g)}}{\text{massa do EB (g)}} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

Estas amostras foram matrizes em protocolos específicos para a realização dos estudos de perfil fitoquímico, potencial alelopático, antioxidante e antimicrobiano.

4.5 Parâmetros físico-químicos para a qualidade de amostra vegetal

4.5.1 Determinação dos teores de água das folhas frescas e de umidade das folhas secas de *P. marginatum*

O teor de água presente nas folhas frescas de *P. marginatum* foi realizado por método gravimétrico descrito por Braga (2007), com modificações. Pesou-se 30 g da planta fresca e triturada e transferiu-se para formas de alumínio (com dessecação até peso constante e tara prévios), em triplicata. O material vegetal foi submetido à secagem em estufa com temperatura de 50°C durante vinte e quatro horas, em ciclos de aquecimento-resfriamento até peso constante. Sendo então resfriado em dessecador e tendo suas massas aferidas. O resultado está apresentado em porcentagem de água em relação ao material vegetal fresco.

Posteriormente, para determinação da umidade da amostra, pesou-se 7 g do material vegetal seco e triturado, submetendo-o a temperatura de 105°C durante 5 horas, seguidas de ciclos de aquecimento-resfriamento até peso constante. O teste foi realizado em triplicada e os resultados foram expressos em teor de umidade em relação às folhas secas, conforme Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010).

4.5.2 Determinação do teor de cinzas totais das folhas secas de *P. marginatum*

Foi empregado o método descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Pesou-se 2,5 g das folhas secas de *P. marginatum* oriundas do teste de umidade. Em seguida transferiu-se a referida massa e a distribuiu uniformemente em cadinhos cerâmicos previamente tarados, em triplicata. Incinerou-se aumentando gradativamente a temperatura até, no máximo, 550°C, e até que todo o carvão fosse eliminado. Resfriou-se em dessecador e aferiu-se a massa. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à massa seca.

4.6 Análise fitoquímica

As classes de metabólitos analisadas foram clorofilas, carotenoides, taninos, fenólicos totais, cianidinas, flavonoides e fitoesteroides.

As análises de identificação e quantificação de clorofilas (A e B) e carotenoides, taninos e antocianidinas foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica do ICET/UFAM. Já as análises para compostos fenólicos, flavonoides, fitoesteroides e atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da UFPR, sob responsabilidade dos Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel, Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Warumby Zanin, Prof.^a Dr.^a Marilis Dalarmi Miguel, Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Gáspari Dias. As análises cromatográficas em cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em parceria com a Dr.^a Maria da Graça Teixeira de Toledo, responsável pela Central Analítica, também pertencente ao departamento de Farmácia da UFPR.

4.6.1 Determinação do conteúdo total de clorofilas A e B, e carotenoides

Estes ensaios foram realizados conforme metodologia adaptada de Dere, Gunes e Sivaci (1998).

O extrato bruto e frações foram solubilizadas em álcool comercial 96°GL a concentração de 1000 µg/mL. E as absorbâncias das soluções foram determinadas por espectrofotômetro nos comprimentos de onda 666 (A), 653 (B) e 470 nm (Car).

Foram utilizadas as equações 3, 4 e 5 para os cálculos de conteúdos totais dos metabólitos, expressos em mg/g.

$$TCIA = (15,65 \times A_{666}) - (7,340 \times A_{653}) \quad \text{Equação 3}$$

$$TCIB = (27,05 \times A_{653}) - (11,21 \times A_{666}) \quad \text{Equação 4}$$

$$TCar = (1000 \times A_{470}) - (2,860 \times TCIA) - (129,2 \times [TCIB/245]) \quad \text{Equação 5}$$

4.6.2 Determinação do conteúdo total de fenólicos

O conteúdo total de fenólicos (TFen) do EB e das frações foi determinado conforme descrito por Singleton e Rossi (1965), adaptado de Folin e Dennis (1915), com modificações.

As soluções do extrato bruto e frações foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol.

Uma solução-mãe de ácido gálico (1 mg/mL), em metanol, foi preparada como padrão. A partir dessa foram transferidos volumes de 50, 100 e 150 µL para tubos de ensaios. Na sequência foram adicionados 150, 100 e 50 µL de metanol aos tubos, respectivamente.

Em seguida acrescentou-se aos tubos 400 µL do reagente de Folin-Ciocalteu® e 600 µL de etanol 70% m/v. As referidas soluções foram mantidas em temperatura ambiente durante 5 minutos com posterior adição de 2 mL de carbonato de sódio 20% (m/v), obtendo-se a curva padrão nas concentrações de 3, 8 e 16 µg/mL.

No teste repetiu-se o procedimento anterior, substituindo-se o padrão por 100 µL das amostras e 100 µL de metanol em cada tubo, e ao tubo branco adicionando-se apenas metanol. Adicionalmente as amostras foram aquecidas em banho-maria a 40°C por 20 minutos, e posteriormente resfriadas em banho de gelo.

Os valores de absorvância das amostras foram determinados por espectrofotometria a 760 nm. As concentrações de compostos fenólicos totais foram calculadas através da curva de calibração de regressão linear a partir das soluções padrões e as concentrações foram expressas em mgAG/g.

4.6.3 Determinação do conteúdo total de taninos

Para a quantificação do conteúdo total de taninos utilizou-se metodologia baseada nos estudos de Ribéreu-Gayon *et al.* (2006). Preparou-se dois tubos-teste codificados (1 e 2) para cada amostra (EB e frações) na concentração de 0,5 mg/mL. Todas as amostradas foram preparadas em etanol 96°GL. Nas referidas soluções foram acrescentados 3 mL de HCl concentrado e 1 mL de água destilada.

Os tubo-teste 1 foram aquecidos em banho-maria a 100°C durante 30 minutos, e aos tubos-teste 2 foram adicionados 0,5 mL de etanol 96°GL. Os valores de absorvância (ΔOD) dos tubos-teste 1 foram determinados em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 520 e 570 nm, e os tubos-teste 2 de cada amostra foram utilizados como solução branco. As equações 6 e 7 foram utilizadas para efetuar o cálculo de dois novos valores de ΔOD 520.

$$\Delta OD 520 = 1,10 \Delta OD 470$$

Equação 6

$$\Delta OD 520 = 1,54 \Delta OD 570$$

Equação 7

O conteúdo de taninos totais foi calculado com base na equação 8 aplicando-se o menor valor de ($\Delta OD 520$), que foi determinado experimentalmente ou calculado, e a concentração foi expressa em mg/g.

$$TTan = 15,7 \Delta OD 520$$

Equação 8

4.6.4 Determinação do conteúdo total de flavonoides

A mensuração de flavonoides foi realizada pelo método colorimétrico do tricloreto de alumínio, com absorvâncias determinadas em espectrofotômetro a 415nm, adaptado de Chang *et al.* (2002). Este ensaio utilizou a rutina como substância de referência para obtenção da curva de calibração.

As amostras (EB e frações) foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em metanol P.A.

Uma solução-estoque de rutina foi preparada na concentração de 1 mg/mL. Desta solução, foram transferidas alíquotas de 50, 100 e 150 μ L para tubos de ensaio e estes foram completados com volumes de 150, 100 e 50 μ L de metanol, respectivamente, obtendo volumes de 200 μ L nos tubos. A estes 200 μ L também foram adicionados 400 μ L de uma solução de cloreto de alumínio a 2% e 4,4 mL de metanol. Obteve-se a curva de calibração da rutina nas concentrações finais de 10, 20 e 30 μ g/mL. Para as amostras, o mesmo procedimento foi adotado e utilizou-se 200 μ L destas ao invés do padrão rutina. Em seguida, os valores de absorvância dos padrões e das amostras foram determinados em espectrofotômetro.

A equação da curva de calibração da rutina foi utilizada para efetuar o cálculo de quantificação e determinar a concentração de flavonoides totais nas amostras de EB e frações FH, FC, FAE e FR, que foram expressas mg/g.

4.6.5 Determinação do conteúdo total de antocianinas

A análise do teor total de antocianinas foi realizada de acordo com Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), utilizando análise em duplicata do EB e das frações na

concentração de 0,5 mg/mL preparados em etanol 96°GL. Em cada amostra foi acrescentado 0,5 mL de HCl 0,1% em etanol 96°GL e 10 mL de HCl 2% aquoso.

Como as análises foram efetuadas em duplicata, as primeiras amostras foram diluídas com 4 mL de água destilada e as segundas foram tratadas com 4 mL de bissulfito de sódio (NaHSO₃) 13% aquoso. As amostras foram então diluídas ao dobro do seu volume original pela adição de etanol 96°GL.

As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 520 nm, contra as amostras não tratadas com bissulfito de sódio que serviram como soluções-branco.

Os valores de absorvância encontrados foram multiplicados pelo fator 875, que fornece as concentrações de antocianidinas totais, que foram expressas em mg/g.

4.6.6 Determinação do conteúdo total de fitoesteroides

A determinação do conteúdo total de fitoesteroides (TFet) foi efetuada segundo descrito por Daksha *et al.* (2010).

Para a quantificação do teor total de fitoesteroides foi construída uma curva de calibração para colesterol em concentrações de 95, 173, 239, 295 e 343 µg/mL, partindo de uma solução-mãe de 1 mg/mL em clorofórmio (ao transferir 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mL). Em seguida, 1 mL do reagente Lieberman-Burchardt foi adicionado às soluções padrões com exceção do branco, seguidos da adição de 4,5 mL de clorofórmio.

As amostras de EB e frações foram preparadas nas concentrações de 10 mg/mL. Em tubos de ensaios foram adicionados 200 µL das amostras, seguidas da adição de 1 mL do reagente Lieberman-Burchardt, e posteriormente foram adicionados 4,5 mL de clorofórmio.

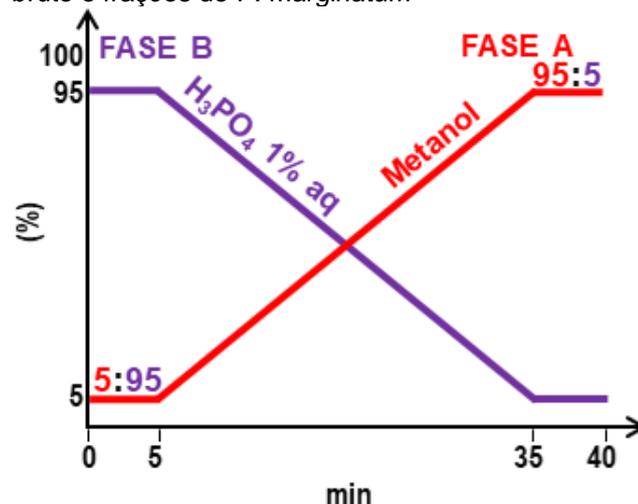
As amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente ao abrigo de luz durante 15 minutos. Decorrido esse tempo, foram submetidas à análise em espectrofotômetro em 640 nm, e os cálculos das concentrações de fitoesteroides foram determinados a partir da curva de calibração do colesterol e expressas em mg/g.

4.6.7 Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

O método utilizado para análise das amostras por CLAE foi similar ao descrito por De Paula (2014). Onde o perfil das amostras foi verificado por cromatógrafo Varian®, modelo Pro Star, composto por bomba L2130 Elite LaChrom®, degaseificador de solventes L7812 Lachrom®; válvula de injeção Rheodyne® 7725i, detector DAD L2450 Elite Lachrom, e interface EZChrom Elite® conectada ao sistema operacional Windows® NT. Foi utilizada coluna C-18 - fase reversa (Waters 150 mm x 4,6 mm), com *loop* de 20 µL, à temperatura de 25 °C, em taxa de fluxo de 1 mL/min, e detecção por varredura de espectro de 200 nm a 400 nm. As amostras foram preparadas em metanol grau CLAE na concentração de 5 mg/mL (EB) e 2,5 mg/mL (frações) e foi utilizada solução padrão de vitexina 10 µg/mL.

O sistema de eluição consistiu de uma corrida composta por uma mistura de metanol (Fase A) e ácido fosfórico aquoso a 1% v/v (Fase B). Onde de 0 a 5 minutos o eluente conteve 5% de Fase A e 95% de Fase B. Depois do quinto minuto, até o minuto trinta e cinco a condição experimental foi ajustada para ascender continuamente até atingir 95% de Fase A e 5% de Fase B. Proporção esta que foi mantida até aos 40 minutos (Figura 9).

Figura 9 – Ilustração do gradiente de eluição em CLAE (C-18 fase reversa) em corrida de 40 minutos para a verificação do perfil cromatográfico do extrato bruto e frações de *P. marginatum*



Nota: H₃PO₄: ácido fosfórico; aq: aquoso.

Fonte: Nunes (2018).

O sinal do composto principal foi avaliado comparando o seu espectro de absorção ultravioleta (UV) com padrões disponíveis em banco de dados para identificação, e coelundo as amostras com o padrão de similaridade de pelo menos 99% entre os espectros de absorção em UV. A quantificação do composto majoritário foi realizada por curva de calibração construída com injeções de 5 concentrações, em triplicata (5 µg/mL a 50 µg/mL) do padrão de vitexina. O resultado foi comparado com bancos de dados disponíveis na literatura.

4.7 Estudos anatômicos e histoquímicos

Para o estudo histoquímico, folhas frescas de *P. marginatum* foram seccionadas para retirada de amostras da região mediana do limbo e das regiões basal, mediana e apical do pecíolo (Figura 10A), correspondentes à folha do terceiro nó, e fixou-se em formalina tamponada (FNT) e em sulfato ferroso (SFF) – teste para compostos fenólicos (JOHASEN, 1940), por 48 horas (Figura 10B). Em seguida as amostras foram estabilizadas em etanol 70% (BERLYN *et al.*, 1976; CORTEZ *et al.*, 2016).

Figura 10 – Regiões da folha de *P. marginatum* retiradas para análises morfoanatômicas e histoquímicas (A) e processo de fixação em sulfato ferroso (SFF) e formalina neutra tamponada (FNT) (B) para análises anatômicas e histoquímicas



Fonte: Nunes (2018).

Folhas inteiras e fragmentos da base, meio e ápice foram submetidos à técnica da diafanização por meio de hidróxido de sódio (NaOH) a 5% até despigmentação (SASS, 1951) e clarificação em hipoclorito de sódio (NaClO) 10% (VASCO *et al.*, 2014). Após lavagem e estocagem em etanol 70%, o material foi

corado em violeta cristal 1% e fucsina básica, e montados em gelatina, de acordo com Roeser (1972).

Fragmentos das amostras fixadas foram embebidos em metacrilato de resina (Historesina Leica; Microsistema Leica, Heidelberg, Alemanha). Com auxílio de micrótomo rotativo (Leica RM2155, Deefield. EUA) foram obtidas secções transversais e paradérmicas com 5 µm de espessura. As secções foram coradas com azul de toluidina pH 4,7 (O'BRIEN, FEDER; McCULLY, 1964).

O material fixado em formalina neutra tamponada (FNT) foi seccionado transversalmente à mão livre com auxílio de embaúba (*Cecropia* sp.) e micrótomo de mesa. Os cortes obtidos foram corados em azul de toluidina para descrição geral do padrão anatômico e submetidos a testes histoquímicos específicos: azul de Coomassie para detecção de proteínas totais (FISHER, 1968), PAS (Reagente de Schiff/ ácido periódico) para polissacarídeos de cadeia longa (O'BRIEN; McCULLY, 1981; McMANUS, 1948), *Sudan Red* para lipídios totais (PEARSE, 1972), NADI - Reagente NADI (DAVID; CARDE, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas, e reagente de Wagner para alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981).

Para detecção de compostos fenólicos o material fixado em sulfato ferroso (SFF) foi seccionado e analisado, de acordo com (JOHANSEN, 1940).

As análises morfoanatômicas foram realizadas no Laboratório de Botânica do ICET-UFAM e no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Observações e fotografias foram obtidas utilizando um microscópio de luz (Leica DM500) equipado com uma câmera digital (Nikon A100). O tratamento das imagens foi feito com *software* livre Inkscape© versão 0.92.3.

4.8 Análise do potencial alelopático

4.8.1 Ensaio de germinação

No bioensaio de germinação foi utilizado a metodologia proposta por Macías *et al.* (2005). As sementes de alface (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*) e cebola (*Allium cepa* L. var. *write creole*) foram colocadas em placas de Petri contendo papel filtro com EB ou frações reconstituídos em soluções aquosas nas concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, tudo em quadruplicata. No teste controle negativo pôs-se a água destilada utilizada para as soluções testadas. Todas as placas foram

incubadas em câmara de germinação e crescimento por 7 dias para alface (*L. sativa* L.) e 14 dias para cebola (*A. cepa* L.), a 25°C, em sistema de fotoperíodo de 12h.

A monitoração diária do número de sementes germinadas foi realizada a cada 24 horas. Nesse processo a protrusão radicular com no mínimo 2 mm de comprimento foi considerado critério positivo.

O ensaio foi concluído quando observada a paralisação da germinação por 3 dias consecutivos. A germinação foi avaliada por meio do IVG (índice de velocidade de germinação) (MAGUIRE, 1962) e porcentagem de germinação (LABOURIAU, 1983).

O IVG foi calculado para cada repetição de cada tratamento utilizando a quantidade de sementes germinadas, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação (Equação 9), em que G1, G2, G3, G4... Gn é o número de sementes germinadas e N1, N2, N3, N4... Nn é o número de dias após a sementeira. As médias dos IVG foram submetidas à análise estatística.

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \frac{G_4}{N_4} \dots \frac{G_n}{N_n} \quad \text{Equação 9}$$

4.8.2 Ensaio de crescimento

O teste foi procedido conforme metodologia descrita por Barnes e Putnam (1987) e Macías *et al.* (2000). Após três dias da protrusão radicular, foi medido o alongamento da raiz e do hipocótilo e/ou coleótilo (10 plântulas por placa) com auxílio de papel milimetrado.

4.9 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do fosfomolibdênio

Este método foi executado com base em Prieto *et al.* (1999). O complexo fosfomolibdênio é formado pela reação da solução de fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL), ácido sulfúrico 3 M (20 mL) e água destilada (q.s.p. 100 mL), preparado no momento do ensaio. As amostras de EB e frações foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol.

Em tubos de ensaios foram adicionados 300 µL (60 µL das amostras + 240 µL de metanol) das soluções das amostras preparadas anteriormente, seguida da

adição de 3 mL do reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Logo após, foram resfriados e as absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 695 nm.

Como branco da análise foram utilizadas soluções contendo 300 µL de metanol adicionados a 3 mL do reagente do complexo do fosfomolibdênio. O poder redutor das amostras foi comparado com o padrão ácido ascórbico (200 µg/mL) cujo poder redutor foi normalizado para 100% (BALESTRIN *et al.*, 2008).

4.10 Análise do potencial antibacteriano

A análise do potencial antibacteriano foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UNIBRASIL), sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Cristina Peitz de Lima e Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia P. dos Santos.

Esta análise foi realizada segundo Salvagnini *et al.* (2008) e Ostrosky *et al.* (2008). A verificação do potencial antibacteriano do EB e frações foi feita frente às cepas-padrão *Escherichia coli* (ATCC 1229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1239), *Salmonella typhimurium* (ATCC 1243), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1248) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1251).

As cepas foram repicadas em caldo nutritivo Brain-Heart Infusion (BHI) e incubadas em estufa a 35°C por vinte e quatro horas. Em seguida uma alíquota foi semeada em ágar Mueller Hinton e incubada novamente em estufa a 35°C pelo mesmo período.

Posteriormente uma suspensão de 2 mL de salina estéril foi preparada com as amostras, utilizando como ajuste de turbidez o tubo número 0,5 da escala de MacFarland (10^8 UFC/mL).

O EB e frações foram preparados na concentração de 100 mg/mL em etanol 70% e volumes de 10 µL foram impregnados em discos de papel estéril de 10 mm de diâmetro com o auxílio de micropipeta. Os discos foram distribuídos em placas de Petri e secos em estufa a 35°C. Em seguida as placas foram incubadas invertidas na estufa a 35°C por mais vinte e quatro horas. Posteriormente, procedeu-se a medição dos halos de inibição.

Como padrão positivo de inibição utilizou-se o cloranfenicol 30 µg. Como controle negativo discos de papel estéril foram impregnados com o solvente utilizado

para diluir as amostras. Foi feito também o controle de esterilidade do meio, no qual duas placas foram incubadas sob as mesmas condições do ensaio para as amostras. O teste foi realizado em duplicata.

4.11 Análise de dados

Para as determinações de metabólitos os resultados foram gerados em planilhas do Excel[®] e expressos como média \pm desvio padrão.

Para o teste do potencial antioxidante foram definidas como variáveis as frações em função do poder redutor do complexo fosfomolibdênio. O teste foi realizado pelo método one-way ANOVA. O gráfico foi construído utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism[®] 7.0.

Para a análise de dados do potencial alelopático foram consideradas como variáveis independentes as frações e concentrações e avaliados o efeito sobre as variáveis dependentes comprimento, hipocótilo, radícula e IVG das plântulas. Para isso, foi utilizado a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), seguido pelo teste post hoc Tukey's HSD a 5% de significância, quando necessário.

Com os resultados obtidos no teste de Tukey, foram gerados gráficos de comparação entre as interações das frações e as concentrações sobre as variáveis dependentes. As análises foram feitas com o software estatístico R, versão 3.3.2 (R *Development Core Team*, 2016) através do pacote Vegan (OKSANEN *et al.*, 2013) e do pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimentos dos processos de extração e particionamento

Após a extração e o particionamento do EB das folhas frescas de *P. marginatum* foram determinados os rendimentos, em massa e teor, do EB (Eq. 1) e de cada fração (Eq. 2), descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimentos em massa (g) e teores (%) do extrato bruto e frações das folhas frescas de *P. marginatum*

Amostras	Rendimento de extração	
	(g)	(%)
EB	31,07 g	3,03
Rendimento das frações		
FH	9,67	31,13
FC	0,39	1,25
FA	0,30	0,97
FR	13,13	42,27
Perdas	7,58	24,38

Nota: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; g: grama.

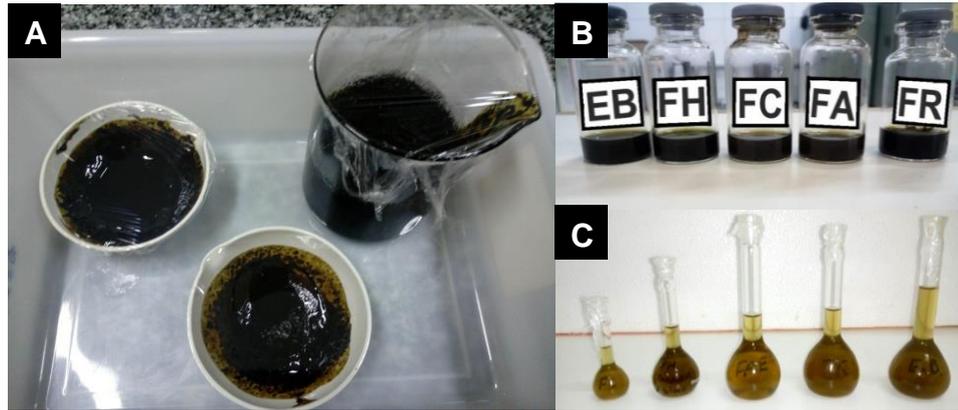
Fonte: Nunes (2018).

O rendimento absoluto do EB foi de 31,07 g, o que correspondeu a 3,03% de sólido do material vegetal fresco (Tabela 2).

O EB e suas frações constituíram-se de massa pastosa espessa com coloração esverdeada escura (Figura 11A). Este mesmo perfil foi observado por De Núñez e Johnson (1943) em extrato de folhas de um exemplar de *P. marginatum* de Porto Rico, coletado de outubro a dezembro de 1940.

Em solução as colorações do EB e frações variaram de verde escura a amarelas-citrino translúcida (Figura 11B, C).

Figura 11 – Extrato seco (A) e soluções (B e C) do extrato bruto e frações de *P. marginatum*, para testes fitoquímicos



Nota: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente.

Fonte: Nunes (2018).

Vale ressaltar que este trabalho utilizou folhas frescas para a obtenção do EB, isso consequentemente elevou o teor de água do mesmo. Então, por essa particularidade foi utilizado etanol 96°GL, um solvente com grau de polaridade compatível para favorecer a extração de compostos mais próximos do metabolismo do vegetal, objetivando adicionalmente o estudo de parâmetros em alelopatia.

Não foram encontrados outros trabalhos com folhas frescas de *P. marginatum* para fins de comparação de rendimentos. Porém, Oliveira *et al.* (2011), em seus estudos em alelopatia, realizados somente com extratos aquosos de folhas frescas de outra espécie, indicaram utilizar gradiente de polaridade.

Um teor de 4,17% das folhas secas pulverizadas de *P. marginatum* com metanol a frio foi obtido por Reigada *et al.* (2007). Também de folhas secas Araújo *et al.* (2014) obtiveram um teor de 5,18% através do método de extração acelerada por solvente, tendo-se adaptado metodologias de Reigada *et al.* (2007) e Hanwen *et al.* (2012), a 40°C e 1700 psi, com posterior pressão reduzida em evaporador rotatório.

A fração FH resultou em 9,67 g, sendo a de maior teor extrativo (31,13%) se comparada às frações FC (1,25%) e FA (0,97%) - até 30 vezes maior que a fração FA (Tabela 2). A fração FH geralmente extrai metabólitos primários como clorofilas, carotenoides, lipídeos, e secundários como esteroides, terpenoides, acetofenonas e outros compostos de baixa polaridade (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; Da CUNHA *et al.*, 2008). A fração hexano de folhas secas de *P. marginatum* de exemplares do estado de Pernambuco, do trabalho de Araújo *et al.* (2014), foi duzentas vezes maior que a fração mais polar obtida por eles, por fracionamento em cromatografia em coluna (CC).

A massa determinada da fração clorofórmica (FC) foi de 0,39 g. Comumente essa fração tem afinidade com compostos de polaridade intermediária (Da CUNHA *et al.*, 2008) como alguns lignanas, terpenoides, cumarinas, flavonoides como agliconas de derivados flavônicos, a exemplo de algumas antocianidinas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

A fração acetato de etila (FA) obteve o menor teor (0,97%) entre as demais, com massa de 0,30 g. Normalmente essa fração extrai substâncias de média a alta polaridade como flavonoides monoglicosilados, alcaloides mais polares, cumarinas e antraquinonas glicosídicas, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e compostos fenolicos em geral (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O resíduo resultante do particionamento foi uma massa aderente mensurada em 13,13 g, denominado fração remanescente (FR). Nessa fração comumente se detecta alguns carboidratos, taninos e cianidinas.

Esses resultados, concordantes com o da literatura, indicam que o perfil do extrato de folhas da espécie tende à presença de substâncias de média a baixa polaridade. O método de particionamento sólido-líquido possivelmente contribuiu para que as frações FC e FA resultassem em teores reduzidos, respectivos 1,25% e 0,97%, comparados ao da fração FH (31,13%), e conseqüentemente avolumasse a fração FR (Tabela 2). Tal método usa menores tempo e superfície de contato entre o solvente e as moléculas dos compostos das amostras.

5.2 Parâmetros físico-químicos para a qualidade de amostra vegetal

5.2.1 Teores de água das folhas frescas e umidade das folhas secas de *P. marginatum*

O teor de água quantificado das folhas frescas foi de $76,14 \pm 1,10\%$. Não se encontrou trabalhos científicos sobre o teor de água das folhas frescas da espécie, para fins comparação. Devido ao alto teor de água nos vegetais há necessidade de um processo eficaz de secagem pós-colheita. Por isso os processos de secagem artificiais podem ser benéficos para o aumento no rendimento dos princípios ativos e a redução no tempo necessário para completar o processo de secagem, com conseqüente redução nos custos (RADÜNZ *et al.*, 2001).

O teor de umidade foi de $4,58 \pm 0,04\%$. Um dos primeiros registros desse parâmetro em *P. marginatum* utilizou uma metodologia similar à deste trabalho e obteve 14,06% (De NÚÑEZ; JOHNSON, 1943). Todavia, a referida pesquisa partiu de uma matriz seca em temperatura ambiente não especificada, o que pode explicar teor maior se comparado ao deste trabalho.

O teor de umidade é importante para o controle de qualidade vegetal, para favorecer a segurança de análises posteriores, e na preparação de extratos, rendimento e identificação dos constituintes (FARIAS, 2003), além do controle microbiológico para o armazenamento (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011).

O teor máximo de umidade preconizado nas diferentes farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções descritas em monografias oficiais (BRASIL, 2010). Portanto o valor aqui encontrado está abaixo do relatado nas monografias. Segundo Farias (2003), esta mensuração pode ser devido ao elevado teor de óleo volátil da planta, fato que eleva consideravelmente o percentual de perda de massa, e interfere no teor final de umidade.

5.2.2 Teor de cinzas totais das folhas secas de *P. marginatum*

O teor de cinzas totais foi de $11,77 \pm 2,58\%$. Esse valor concorda com o teor de 10,69% relatado por Sequeda-Castañeda *et al.* (2015).

O teor de cinzas totais é um parâmetro que estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis presentes em uma amostra e expressa a soma da matéria inorgânica intrínseca (sais minerais do vegetal) e as substâncias de origem externa ou matéria inorgânica extrínseca – como areia e terra, permitindo assim a verificação de impurezas que podem estar presentes na amostra como contaminantes (BRAGA *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2007).

O resultado obtido neste trabalho está dentro de limites estabelecidos nas monografias de várias drogas vegetais descritas, que é abaixo de 14% (De PAULA, 2014). Por isso, o valor mensurado pode ser usado como referência para outros trabalhos e pode contribuir para a futura definição de padrões de qualidade e caracterização da espécie vegetal.

5.3. Quantificação de importantes metabólitos

As classes de metabólitos analisadas nas folhas de *P. marginatum* foram clorofilas, carotenoides, taninos, fenólicos totais, cianidinas, flavonoides e fitoesteroides.

O resultado da análise quantitativa dos metabólitos está descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Total dos metabólitos analisados no extrato bruto e frações de *P. marginatum* (mg/g)

Classe	Tratamento				
	EB	FH	FC	FA	FR
TCla	9,34 ± 0,07	9,80 ± 0,07	10,45 ± 0,10	7,66 ± 0,03	7,19 ± 0,87
TCIb	5,20 ± 0,00	5,85 ± 0,07	6,07 ± 0,09	2,88 ± 0,09	4,23 ± 0,08
TCar	573,20 ± 2,67	494,88 ± 3,47	588,58 ± 3,80	346,91 ± 5,55	538,18 ± 2,39
TFen	103,44 ± 0,01	72,13 ± 4,14	115,02 ± 16,40	161,95 ± 0,59	157,97 ± 4,77
TTan	0,33 ± 0,04	0,35 ± 0,06	0,55 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,20 ± 0,02
TFIv	56,43 ± 0,49	62,22 ± 13,34	55,95 ± 4,87	32,05 ± 0,68	41,76 ± 0,97
TAnt	6,13 ± 0,88	5,83 ± 1,34	7,29 ± 1,34	7,88 ± 2,63	7,58 ± 1,82
TFet	280,71 ± 1,11	301,86 ± 6,18	286,47 ± 11,59	246,09 ± 5,55	244,17 ± 4,84

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão das triplicadas do extrato bruto e frações das folhas frescas de *P. marginatum*; EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; TCla: total de clorofila A; TCIb: total de clorofila B; TCar: total de carotenoides; TTan: total de taninos; TFe: total de fenólicos; TFIv: total de flavonoides; TAnt: total de antocianidinas; TFet: total de fitoesteroides.

Fonte: Nunes (2018).

Foi possível quantificar todos os metabólitos propostos em todas as frações e fazer relação de seus fitoconstituintes e suas potencialidades biológicas.

O EB possui um perfil moderadamente apolar (pelos valores mais próximos das frações FH e FC) e concordou com o aspecto graxo e untuoso observado na massa do seu rendimento, bem como com o indicado pela histoquímica da folha, quanto à presença de substâncias lipossolúveis como óleos e resinas. Porém a mensuração descrita na Tabela 3 também indica considerável teor entre as frações polares das folhas de *P. marginatum*.

5.3.1 Determinação do conteúdo total de clorofilas A e B, e carotenoides

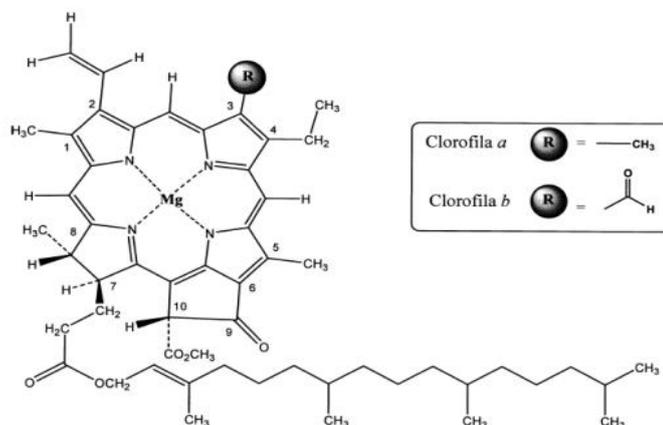
O teor de clorofila A foi maior do que de clorofila B em todas as frações e EB (na FA foi 2,7 vezes maior) (Tabela 3). Uma vez que normalmente em plantas superiores o teor de clorofila A é superior ao de clorofila B numa proporção de 3:1 respectivamente, infere-se que as folhas do exemplar vegetal estudado está dentro do comumente relatado na literatura, embora muitos fatores como estresse ou necessidade adaptativa podem alterar essa razão (ENGEL; POGGIANI, 1991 apud STREIT *et al.*, 2005).

O maior teor de clorofilas e carotenoides foi detectado na fração FC (Tabela 3), o que pode ser explicado pelo fato de a clorofila A e os carotenoides serem moderadamente apolares, podendo ter afinidade com as frações de média a baixa polaridade, como as frações FC e FH.

O teor de clorofilas A e B e carotenoides do EB indicou um perfil muito próximo ao da fração FC (Tabela 3), indicando uma tendência à média polaridade dos seus constituintes.

A quantificação significativa resultante das frações FA e FR pode ser justificada pelas frágeis ligações entre as moléculas de clorofilas (não covalentes), rompendo-se com facilidade ao se submeter o tecido vegetal a solventes orgânicos (STREIT *et al.*, 2005). Essa significância também pode estar associada ao aumento da polaridade da clorofila B em relação à clorofila A, em razão do substituinte aldeído na clorofila B (Figura 12) (VON ELBE, 2000).

Figura 12 – Ilustração da estrutura molecular das clorofilas A e B, com ênfase na diferença de seu substituinte R



Fonte: Adaptado de STREIT *et al.* (2005).

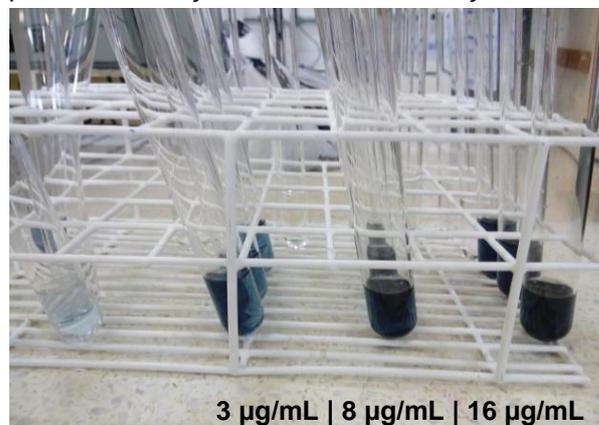
Ressalta-se ainda que os pigmentos fotossintéticos são indicadores de produtividade que podem ser fator limitante ao crescimento e desenvolvimento das plantas (THIESEN *et al.*, 2017), sendo o teor de clorofila nas folhas parâmetro sugestivo também do nível de dano que determinado estresse pode causar ao vegetal (CATUNDA *et al.*, 2005). Por isso o conhecimento do teor das clorofilas pode ser significativo ao associá-lo com a fitoquímica, a histoquímica e a alelopatia, orientando na busca de aleloquímicos específicos. Rice (1984) indica que aleloquímicos podem influenciar na rota de síntese de precursores de porfirina da biossíntese de clorofila.

5.3.2 Determinação do conteúdo total de fenólicos

Os maiores teores de fenólicos foram detectados nas frações FA e FR, respectivamente $161,95 \pm 0,59$ e $157,97 \pm 4,77$ mg/g, e o menor teor foi observado na FH ($72,13 \pm 4,14$ mg/g) (Tabela 3), o que indica que a característica dos fenólicos presentes são mais polares, embora tenham sido quantificados também em frações menos polares e de média polaridade como indicou o EB. Esses resultados estão de acordo com o encontrado na histoquímica, que detectou a presença de compostos fenólicos (Figura 20, Tabela 5).

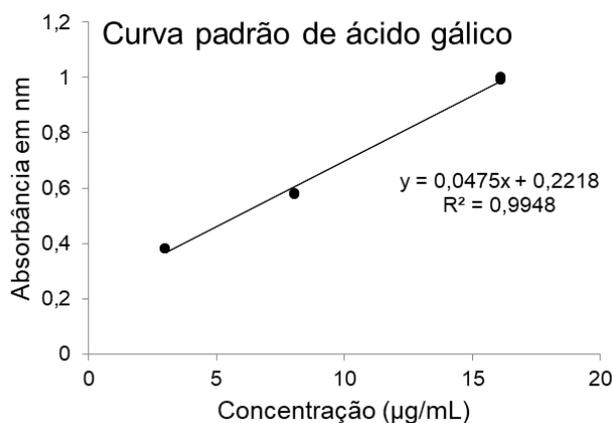
A determinação do conteúdo total de compostos fenólicos foi realizada com soluções-padrão de ácido gálico (Figura 13) e através da equação de regressão linear da curva analítica (Figura 14).

Figura 13 – Soluções-padrão de ácido gálico para determinação da curva de calibração



Fonte: Nunes (2018).

Figura 14 – Curva de calibração do ácido gálico obtida por espectrofotometria em 760 nm utilizando concentrações de 3, 8 e 16 µg/mL



Nota: nm: nanômetro; eixo y: absorvância; eixo x: concentração; R^2 : valor de correlação linear.

Fonte: Nunes (2018).

Em geral o acúmulo de constituintes nas frações mais polares pode indicar uma maior concentração de compostos fenólicos menos complexos como flavonoides monoglicosilados, taninos e cianidinas, o que é corroborado pelos teores de TTan, TFla e TAnt encontrados e descritos na Tabela 3.

Entre os compostos fenólicos estão fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e ligninas. Substâncias fenólicas tem ampla ocorrência no reino vegetal e atuam principalmente como fitoalexinas, atrativos para polinizadores, contribuintes para a pigmentação da planta, antioxidantes e agentes de proteção contra os raios ultravioletas, entre outros (BLAINSKI *et al.*, 2013).

Adicionalmente, entre os resultados deste trabalho, consta a identificação da vitexina por CLAE em fase reversa, um fenólico não complexo. Esse achado concorda com os resultados de Tillequin *et al.* (1978), que identificaram fenólicos em extrato butanólico de folhas de *P. marginatum* da Guiana Francesa.

O alto teor de fenólicos pode contribuir significativamente para o potencial antioxidante encontrado neste trabalho, pois os constituintes fenólicos podem reagir com espécies reativas de oxigênio (KUMAR; PANDEY, 2013). Eles também podem estar envolvidos na ação alelopática detectada neste estudo, embora dificilmente pode-se atribuir a ação a um único composto (BLUM *et al.*, 1993; BLUM, 1996; KRUSE *et al.*, 2000). Alinhando-se a isso, estudos indicaram que misturas de alguns aleloquímicos, como ácidos fenólicos com outros compostos orgânicos como

carboidratos e aminoácidos, podem possuir atividade alelopática, embora concentrações de compostos individuais estiveram significativamente abaixo dos níveis inibitórios da mistura (KRUSE *et al.*, 2000).

Yang *et al.* (2002) concluíram que três compostos fenólicos vegetais alteraram a reação bifásica normal na conversão de precursores de clorofila, possivelmente bloqueando a enzima Mg-quelatase, resultando na escassez da orientação da oferta e consumo de clorofila.

5.3.3 Determinação do conteúdo total de taninos

O maior teor de taninos foi observado na fração FC ($0,55 \pm 0,01$) (Tabela 3). Portanto é possível relacionar esse achado com os taninos de média polaridade. O que pode indicar taninos condensados, os quais são formados a partir de monômeros flavonoídicos (as proantocianidinas) (COWAN, 1999). Porém este trabalho também indicou a presença de taninos hidrolisáveis, que são menores, e ainda sugere a presença de ácidos fenólicos e açúcares simples (GARCÍA; CARRIL, 2009), possivelmente por haver teores consideráveis em frações mais polares como a FA.

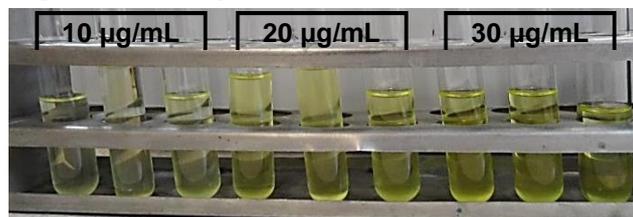
Os taninos estão estreitamente relacionados com várias atividades biológicas. Ação anti-inflamatória significativa foi descrita e atribuída a taninos (MOTA, 1982; MOURA, 1985). Os taninos presentes no vinho tinto têm um efeito benéfico na saúde humana, bloqueando a formação da endotelina-1, uma molécula sinalizadora que causa vasoconstrição (GARCÍA; CARRIL, 2009).

As atividades antimicrobianas dos taninos também estão bem documentadas. O crescimento de muitos fungos, leveduras, bactérias e vírus foi inibido por taninos (CHUNG *et al.*, 2010). Extrato da folha de *Piper nigrum* L. foi efetivo ao sensibilizar as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Proteus* sp. (GANESH *et al.*, 2014). *Piper guineense*, uma Piperaceae da Nigéria, reportada com altos teores de taninos e flavonoides, também apresentou atividade frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* (ANYANWU; NWOSU, 2014).

5.3.4 Determinação do conteúdo total de flavonoides

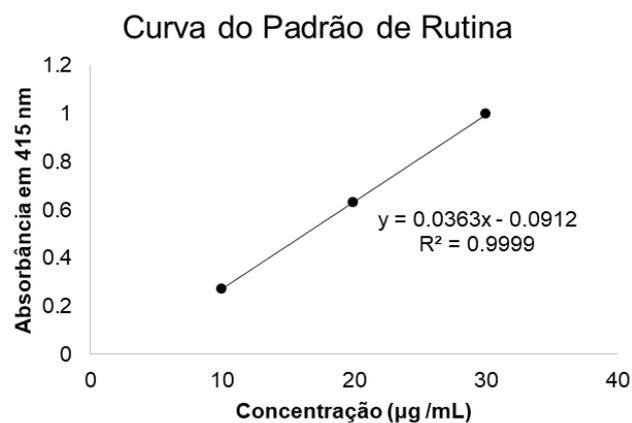
Um valor maior de flavonoides foi encontrado no EB e frações mais apolares (FH e FC) (Tabela 3), indicando a presença de fenólicos com tendência de baixa à média polaridade. Sugere também complexidade quanto aos seus constituintes - mais agliconas e com média complexidade de substuintes na estrutura principal, a exemplo das metoxilas que podem conferir maior volume à molécula e favorecer uma média polaridade.

Figura 15 – Soluções-padrão de rutina



Fonte: Nunes (2018).

Figura 16 - Curva de calibração da rutina obtida através de espectrofotometria em 415 nm, em espectrofotômetro utilizando concentrações de 10, 20 e 30 µg/mL



Nota: nm: nanômetro; eixo y: absorbância; eixo x: concentração; R^2 : valor de correlação linear.

Fonte: Nunes (2018).

Estes resultados concordam com o encontrado por CLAE, onde foi identificada a flavona vitexina. Esse composto também foi identificado e isolado por Tillequin *et al.* (1978) nessa espécie. Neste trabalho foi identificado que este constituinte coeluiu com composto muito similar, o que pode sugerir a presença do seu glicosídeo 6"-O- β -gentiobiosil-vitexina, também encontrado por Tillequin *et al.* (1978).

Flavanonas identificadas e isoladas, com a presença de grupo carbonila, obteve potente ação antifúngica, se comparadas a outras sem o referido grupo, em estudos de folhas de *P. marginatum* coletadas em Manaus, Amazonas, Brasil (REIGADA *et al.*, 2007).

Os flavonoides aqui quantificados podem ser responsáveis pelas atividades antioxidante e alelopática encontradas (YANG *et al.*, 2002; KUMAR; PANDEY, 2013).

5.3.5 Determinação do conteúdo total de antocianinas

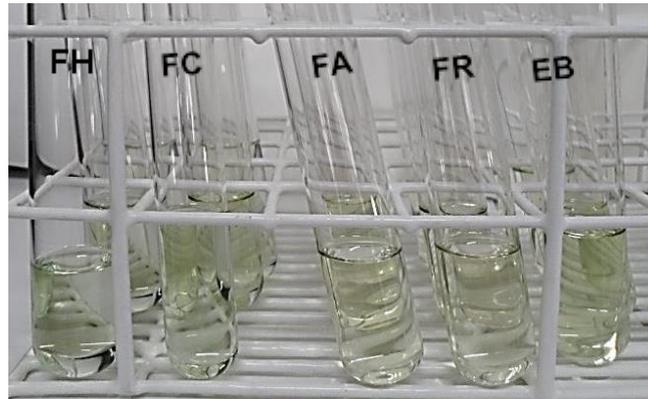
Os maiores teores de antocianinas foram detectados nas frações FA e FR, $7,88 \pm 2,63$ e $7,58 \pm 1,82$ mg/g respectivamente (Tabela 3), resultado este presumível dada a afinidade mais polar dessa classe de compostos. O teor nas demais frações mais apolares pode indicar considerável concentração de antocianidina, que é a aglicona da antocianina, ou um possível sinergismo intermolecular com flavonoides, originando maior estabilidade com menor degradação da antocianina (LOPES *et al.*, 2007).

As funções desempenhadas pelas antocianinas nas plantas são variadas: antioxidantes, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica (LOPES *et al.*, 2007). Com isso, as antocianinas podem contribuir para as ações antioxidantes e alelopáticas encontradas neste trabalho.

5.3.6 Determinação do conteúdo total de fitoesteroides

Os maiores teores de fitoesteroides foram detectados no FH ($301,86 \pm 6,18$), FC ($286,47 \pm 11,59$) e EB ($280,71 \pm 1,11$) (Tabela 3), resultado concordante com as características de média a baixa polaridade desses compostos. Também se observou significativas concentrações nas frações FA e FR, fenômeno que pode ser explicado pela diversidade de estruturas químicas que esses compostos apresentam.

Figura 17 – Soluções para a determinação do conteúdo total de fitosteroides



Nota: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente.

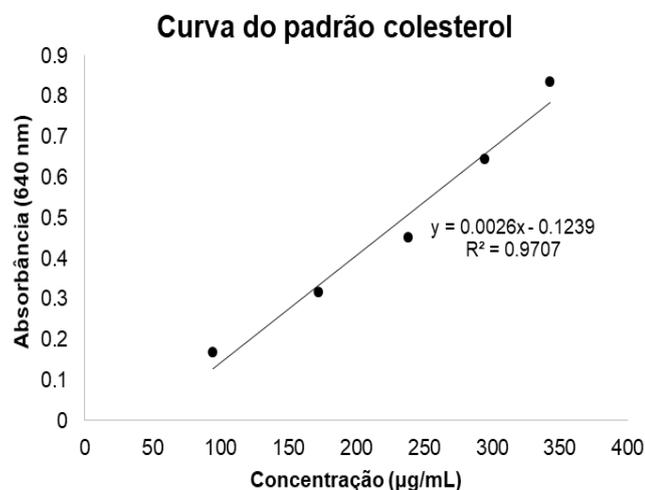
Fonte: Nunes (2018).

Os fitosteroides são encontrados em larga escala na natureza. Estes compostos em conjunto com macro e micro nutrientes são responsáveis pelo crescimento, pela defesa e pela longevidade das espécies vegetais. Foi observado que eles são encontrados das sementes às raízes em todas as plantas, sendo, quantitativamente, variada a sua presença (CLIFTON, 2002).

Quase todos os esteroides de plantas tem um grupamento álcool, e nas plantas os mais abundantes são os similares estigmasterol e o sitosterol. A principal função dos esteróis nas plantas é formar parte das membranas e determinar a sua permeabilidade e estabilidade (DEWICK, 2002; OGBE *et al.*, 2015). Alguns esteroides têm funções de mecanismos de defesa da planta contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros (CLIFTON, 2002).

Considerando as referidas informações, os teores de fitosteroides de *P. marginatum* podem indicar intensa ação de defesa e estrutura de resistência oriundas do metabolismo da espécie, e pode estar associado à ação alelopática encontrada.

Figura 18 - Curva de calibração do colesterol obtida através da espectrofotometria em 640 nm utilizando concentrações de 95, 173, 239, 295 e 343 µg/mL



Nota: nm: nanômetro; eixo y: absorvância; eixo x: concentração; R^2 : valor de correlação linear.

Fonte: Nunes (2018).

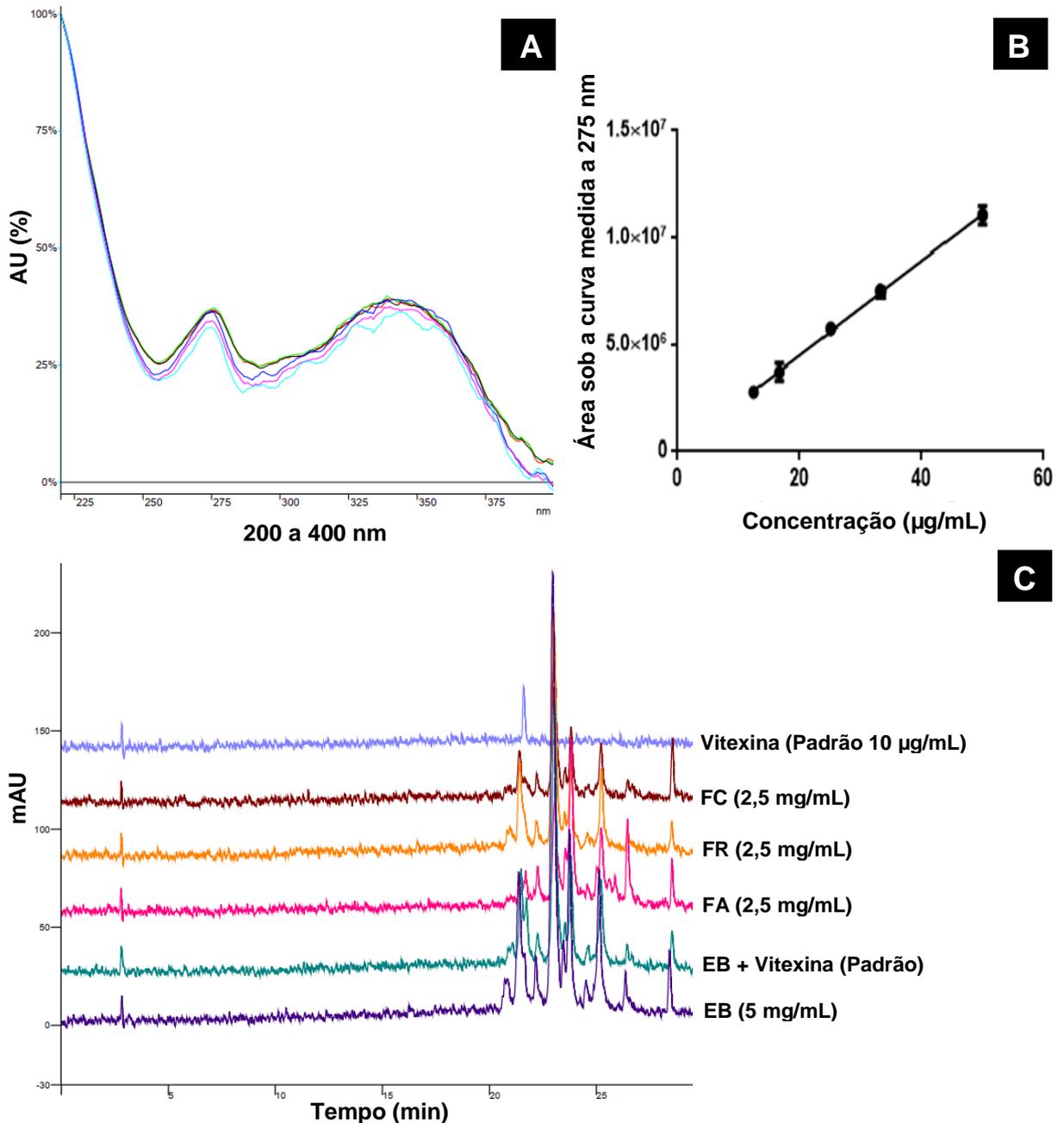
5.4 Resultado da Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

O flavonoide vitexina (Figura 6) foi identificado por comparação dos espectros UV do sinal detectado em 21,73 min (DP 0,02) nas amostras com solução padrão de vitexina (Aldrich > 99% de pureza) preparada a 10 µg/mL, e foi confirmada com mais de 99% de similaridade (Figura 19A, C). O espectro de UV, comparado ao padrão, possui duas bandas características de flavonoides (Figura 19A), que são observadas na faixa de 200 a 400 nm (FERREIRA *et al.*, 2016).

No entanto, apesar da obtenção da curva de calibração de vitexina nas concentrações de 5 µg/mL a 50 µg/mL (Figura 19B), não foi possível quantificar esse flavonoide no EB e frações de *P. marginatum* via CLAE (por coeluir com outro composto). Ademais, o presente achado corrobora com os de Tillequin *et al.* (1978), que além de identificar, também conseguiram isolar a molécula de vitexina e outro flavonoide, C-glicosil nomeado marginatosídeo, do extrato das folhas da espécie.

A vitexina identificada em *P. marginatum* é um glicosídeo de flavona, importante metabólito e responsável por diversas propriedades biológicas. Recentemente sugeriu-se que este composto poderia ser um potencial medicamento substituto para diversas doenças, podendo ser adjuvante em aplicações clínicas ou doenças persistentes (ELE *et al.*, 2016; YANO *et al.*, 2012; ASLAM *et al.*, 2015).

Figura 19 – Cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE). Espectros de ultravioleta (UV) do padrão de vitexina nas cores azuis e rosa e das amostras nas cores verde, preta e vermelha (A), curva de calibração do padrão de vitexina (B) e cromatogramas das amostras (C)



Nota: **A:** Para flavonoides os espectros de ultravioleta (UV) possuem duas bandas características como observada na figura. **C:** Cromatogramas. Padrão de vitexina na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (azul claro); fração clorofórmio (FC) cor vinho; fração remanescente (FR) cor alaranjada; fração acetato de etila (FA) cor rosa; coeluição extrato bruto (EB) + padrão de vitexina (10 $\mu\text{g/mL}$) cor verde escuro; extrato bruto (EB) cor azul escuro.

Fonte: Nunes (2019).

Embora existam fontes que embasem os efeitos biológicos associados à vitexina, não existem estudos sobre o seu potencial alelopático. No entanto, há registros de que o seu precursor metabólico, a apigenina, foi considerado potencialmente alelopático sobre germinação de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

(CIPOLLINI *et al.*, 2008). Este trabalho identificou efeito alelopático das amostras de *P. marginatum* e pode estar associado à vitexina e/ou ao seu precursor.

5.5 Análises morfoanatômica e histoquímica de folha de *P. marginatum*

As folhas de *P. marginatum* são alternadas, simples, de lâmina foliar simétrica, em forma cordada, ápice acuminado e tipicamente cordado na base (Figura 20A, B), o que está de acordo com a primeira descrição desta espécie feita por Jacquin (1786), e por Guimarães e Giordano (2004).

A lâmina foliar desenvolvida mede aproximadamente 9-23 cm de comprimento x 7-18 cm de largura, com nervação palmato-broquidódroma, enquanto o pecíolo apresenta 2-8 cm de comprimento com uma bainha na base (Figura 20A, B). A lâmina foliar é particularmente ciliada na margem (Figura 20C) e um indumento pubescente foi observado apenas nas veias. Em relação à assimetria típica da lâmina foliar em espécies de Piperaceae, *P. marginatum*, com suas folhas simétricas e cordadas, é bastante similar a outras espécies apontadas por Jaramillo *et al.* (2008) como filogeneticamente próximas, como *Piper umbelatum*, *P. multiplinervium*, *P. auritum*, *Piper schwackei* e *Piper peltatum*. Embora *P. auritum* e *P. schwackei* possuam base semelhante de lâmina foliar, diferem de *P. marginatum* pela venação peninérvea, enquanto *P. peltatum* pela inserção abaxial do pecíolo.

Os resultados deste trabalho sugerem alta similaridade morfológica com *P. umbelatum* e *Piper regnellii* (BARDELLI *et al.*, 2008), corroborando que os registros anatômicos fornecem importantes caracteres taxonômicos e que mais estudos filogenéticos são necessários sobre o complexo *P. marginatum*, (JARAMILLO *et al.*, 2008). Em relação à morfologia foliar de outras espécies de *Piper*, *Piper methysticum* Forst. f. (HOFFSTADT, 1916; LEBOT; LÈVESQUE, 1989), *Piper mikianium* (Kunth) Steud. (DUARTE; SIEBENROCK, 2010), *Piper solmsianum* C. DC. (BERTOCCO *et al.*, 2017), *Piper betle* L. (KHAN *et al.*, 2013) e *Piper sarmentosum* Roxb. (RAMAN *et al.*, 2012) são bastante semelhantes.

Os resultados das análises anatômicas de *P. marginatum* mostram tricomas tectores e glandulares distribuídos na superfície adaxial e abaxial da epiderme. O tricoma glandular é constituído por um pedúnculo unicelular curto e uma cabeça celular alongada (Figura 20D), tendo uma distribuição densa através da epiderme da superfície da folha abaxial. Por outro lado, foram observados dois tipos de tricomas

tectores, curtos unicelulares e multicelulares e longos multicelulares, distribuídos predominantemente nas veias e na margem (Figura 20C), o que explica o aspecto ciliado da margem a olho nu. Tricomas glandulares semelhantes foram registrados em *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. (DUARTE; SIEBENROCK, 2010), *P. sarmentosum* Roxb. (RAMAN *et al.*, 2012), *P. solmsianum* C. DC (BERTOCCO *et al.*, 2017), *P. betle* L. (KHAN *et al.*, 2013) e *P. regnellii* (Miq.) C. DC. (SILVA e MACHADO, 1999; PESSINI *et al.*, 2003), *Piper crassinervium* H.B. & K. (ALBIERO *et al.*, 2005a) e *Piper gaudichaudianum* Kuntze (ALBIERO *et al.*, 2005b).

A anatomia da lâmina foliar é composta por células tabulares epidérmicas com a curvatura da parede periclinal externa, na superfície adaxial e abaxial (Figura 20F, G). Camadas subepidérmicas são comumente registradas em espécies de *Piper*, acima de uma ou ambas as superfícies. No entanto, *P. marginatum* apresenta uma única camada de células subdesenvolvidas na superfície abaxial (Figura 20F). Devido à ausência de cloroplastos nestas camadas, eles foram reconhecidos aqui como uma hipoderme.

Na visão transversal da região lateral das veias, a hipoderme pode estar presente na face adaxial. A camada subepidérmica na superfície abaxial de *P. umbellatum* L., intimamente relacionada à *P. marginatum*, originou-se do meristema fundamental, que caracteriza uma verdadeira hipoderme (MARINHO *et al.*, 2011). No entanto, Gogogsz *et al.* (2012) registraram uma variação comum no número de camadas de hipoderme.

Um mesofilo dorsiventral foi observado em *P. marginatum*, com parênquima paliçádico de camada única e número variável de camadas de parênquima esponjoso (Figura 20F). As folhas de *P. marginatum* são tipicamente hipoestomáticas (Figura 20F) e os estômatos são tetra e ciclocíticos, tipicamente encontrados em espécies de Piperaceae (METCALFE; CHALK, 1965).

Cristais de drusas foram observados em células do parênquima paliçádico, bem como associadas a feixes vasculares. Traços anatômicos semelhantes também foram registrados em *P. mikanianum* (DUARTE; SIEBENROCK, 2010), *P. gaudichaudianum* (ALBIERO *et al.*, 2005b), *P. solmsianum* (GOGOSZ *et al.*, 2012; BERTOCCO *et al.*, 2017), e *P. umbellatum* (MARINHO *et al.*, 2011; GOGOSZ *et al.*, 2012).

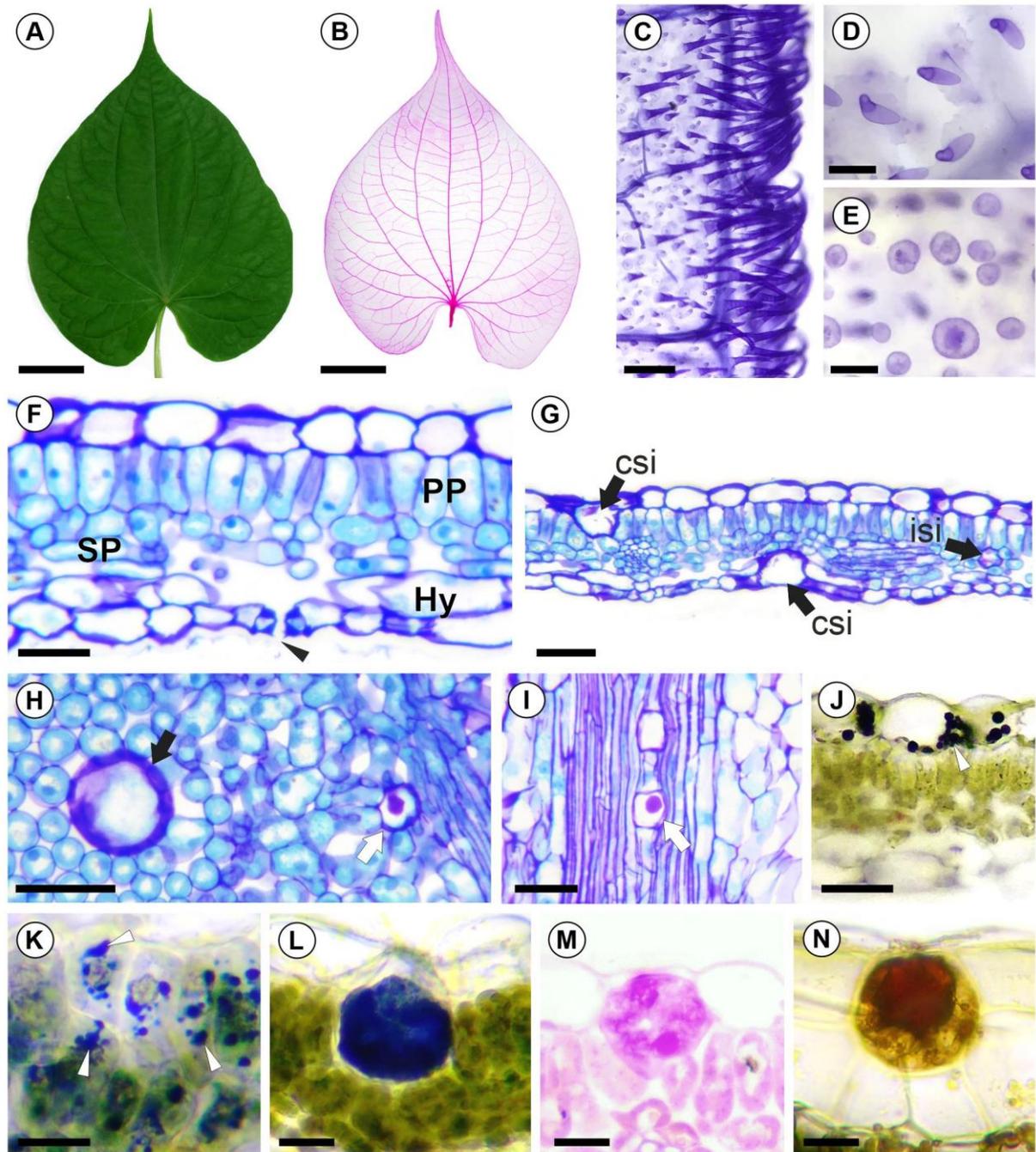
Dois tipos de células secretoras foram registrados na lâmina foliar de *P. marginatum*. Observaram-se células em forma de esfera ovaladas grandes e células

inconspícuas de forma oval, em visão transversal (Figura 20G) e paradérmica (Figura 20E, H, I), tipificando típicos idioblastos secretores. Os maiores idioblastos secretores são encontrados na superfície adaxial e abaxial da epiderme, sendo levemente deprimidos ou no mesmo nível das células epidérmicas adjacentes (Figura 20G). Marinho *et al.* (2011) registraram que através do desenvolvimento da folha, as células epidérmicas que originam o idioblasto secretor aumentam seu volume e crescem intrusivamente no mesofilo. Em *P. marginatum* esses idioblastos conspícuos são imersos no parênquima da paliçada na face adaxial (Figura 20G, H) ou na hipoderme na face abaxial (Figura 20G). Por outro lado, os idioblastos secretores inconspícuos são tipicamente distribuídos nas camadas esponjosas subjacentes ao parênquima da paliçada (Figura 20G).

A posição do idioblasto secretor pode ser variável em diferentes espécies, o que proporciona importante caractere taxonômico. Diferentes posições foram registradas, como epidérmicas (MARINHO *et al.* 2011), subepidérmicas (ALBIERO *et al.*, 2006), espalhadas no mesofilo (GOGOSZ *et al.*, 2012) e associadas a feixes vasculares (NOGUEIRA, 2019). Em *P. marginatum*, diferentes dimensões de idioblastos são registradas pela primeira vez em Piperaceae, assim como um novo padrão é descrito, tendo idioblastos conspícuos e discretos epidérmicos subjacentes ao parênquima da paliçada (Figura 20G).

Apesar da semelhança morfoanatômica, constatou-se que caracteres anatômicos são potencialmente importantes para verificar a identificação taxonômica das controvérsias sobre as espécies de *Piper*.

Figura 20 – Folhas inteiras desenvolvidas e cortes foliares transversais e paradérmicos de *P. marginatum* para caracterizações macro, micromorfológica e histoquímica



Nota: A-B: Morfologia foliar de *P. marginatum*. A: visão geral de folha fresca. B: folha clareada, mostrando vascularização broquidódromo. C-I: Anatomia foliar de *P. marginatum*. C: tricomas tectores na margem da folha. D: tricomas glandulares e E: idioblastos secretores. F: Mesofilo dorsiventral, apresentando parênquima paliádico (PP), parênquima esponjoso (SP), hipoderme na face adaxial (Hy) e estômatos na face abaxial (seta cabeça preta). G: Padrão de distribuição dos idioblastos secretores, adaxial e abaxialmente, e no mesofilo (pretos). H: Visão paradérmica, mostrando idioblastos secretores conspícuos (seta preta) e discretos (seta branca). I: Idioblasto secretor imperceptível nos feixes vasculares (seta branca). J-N: Resultados histoquímicos. J: Compostos fenólicos corados de preto utilizando o teste de amostras fixas de SFF (seta branca). K-L: reação NADH, cor azul indica a produção de óleo essencial, pelas células do mesofilo (seta cabeça branca) ou pelo idioblasto. M: Coloração magenta por ácido periódico / reagente de Schiff (PAS) confirma os polissacarídeos na secreção do idioblasto. N: cor marrom avermelhada na secreção do idioblasto, comprovando a presença de alcaloides. Barras de escala: A, B = 3,4 cm; C = 180 μm ; D = 50 μm ; E = 60 μm ; F = 25 μm ; G = 50 μm ; H, I = 30 μm ; J = 33 μm ; K = 17 μm ; L = 22 μm ; M = 20 μm ; N = 17 μm .

Fonte: Nunes (2019).

Os resultados histoquímicos mostram que as células epidérmicas são comumente preenchidas por compostos fenólicos pela coloração verde em azul de toluidina, bem como de acordo com a cor preta na seção de amostras fixas de SFF (Figura 20J). Similarmente compostos fenólicos foram registrados nos idioblastos de *P. umbellatum* (MARINHO *et al.*, 2011), e nos idioblastos, hipoderme e células do mesofilo de *Piper tuberculatum* (NOGUEIRA, 2019).

Os resultados para reação de PAS foram positivos na secreção de idioblastos para polissacarídeos, pela cor rosa (Figura 20M). Assim, este é o primeiro registro da presença de polissacarídeos na secreção de ibioblasto.

P. marginatum apresentou resultados positivos para *Sudam Red*, fornecendo evidências da produção de óleos. Os dois tipos de idioblastos oleíferos produzem óleos essenciais, indicados pela cor azul na reação NADI (Figura 20K, L). A produção de óleos essenciais pelos idioblastos também foi registrada em *P. calossum* (SILVA *et al.*, 2017) e *P. tuberculatum* (NOGUEIRA, 2019). Em contraste, a secreção produzida por idioblastos secretores em *P. umbellatum*, é caracterizada como uma mistura de fenol e oleorresinas, que foi indicada pela cor púrpura e avermelhada frente à reação NADI (MARINHO *et al.*, 2011). Além disso, gotas de óleo na paliçada e células esponjosas adquiriram cor azul pelo teste NADI (Figura 20K), o que indica a produção de óleo essencial fora dos idioblastos em *P. marginatum*, como apontado para *P. tuberculatum* (NOGUEIRA, 2019). Esses achados estão de acordo com a presença majoritária de mono e sesquiterpenoides em *P. marginatum*, relatados por Guzman e Brú (2016).

Alcaloides também foram detectados na secreção de *P. marginatum*, como indicado pela coloração marrom avermelhada pelo reagente de Wagner (Figura 20N), também observado por Marinho *et al.* (2011) em *P. umbellatum*. Esse resultado está de acordo com estudos fitoquímicos na espécie, que identificaram alcaloides por CLAE (GUZMAN; BRÚ, 2016).

Embora os resultados dos testes histoquímicos tenham indicado várias classes de metabólitos, a fitoquímica deste trabalho foi direcionada ao estudo dos compostos fenólicos, uma vez que estes estão relacionados com muitas atividades biológicas já descritas, como antibacteriana, antioxidante (KUMAR; PANDEY, 2013; TAMULY *et al.*, 2014) e alelopática (LI *et al.*, 2010).

Tabela 4 - Resultado dos testes histoquímicos em folhas de *P. marginatum*

Teste	Resultados	Locais de reatividade
Compostos fenólicos: SFF	+	Células epidérmicas adaxiais e abaxiais
Alcaloides: Wagner	+	Idioblastos secretores
Lipídeos totais / OE: Sudan Red / NADI	+	Idioblastos secretores e células do mesófilo
Polissacarídeos de cadeia longa: PAS	+	Idioblastos secretores
Proteínas: Azul Coomassie	-	-

Nota: (-) negative (+) positive; SFF: Sulfato ferroso; Wagner reagente (FURR; MAHLBERG, 1981); *Sudan red* (PEARSE, 1980); NADI (α -naftol e cloridrato de dimetilparafenileno diamina): Reagente NADI (Método original: DAVID; CARDE, 1964); PAS: Reagente de Schiff/ ácido periódico (Método original: O'BRIEN; McCULLY, 1981); OE: óleos essenciais.

Fonte: Nunes (2019).

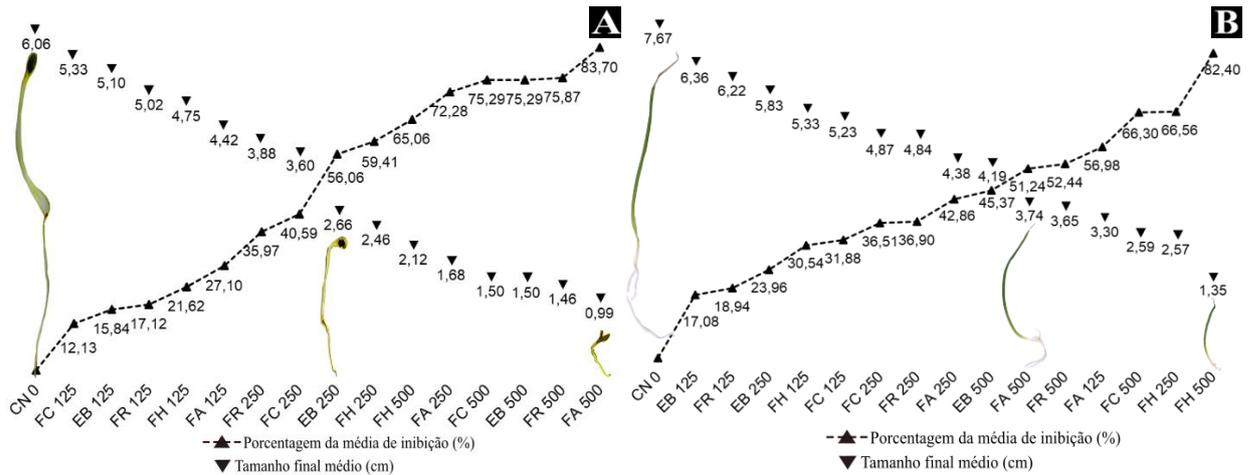
Os caracteres morfoanatômicos aqui descritos de *P. marginatum* provavelmente possuem um valor taxonômico e de potencial para a sua diferenciação de outras espécies de *Piper*. A produção de diferentes compostos pelos idioblastos secretores e células do mesófilo pode direcionar outros trabalhos. Então este estudo pôde contribuir na busca de variáveis anatômicas para diagnosticar e elaborar descrições gráficas e micrográficas que descrevam as espécies com maior precisão, e dá suporte ao controle de fitoterápicos quando da diferenciação de espécies de *Piper*, além de poder evitar erros e adulterações, como o que ocorre entre *P. regnellii* e *P. umbellatum* no sul do Brasil (SALATINO; SILVA, 1975; PESSINI *et al.*, 2003).

Ressalta-se que este trabalho também pode servir de base para futura contribuição social às comunidades nativas, auxiliando-as no conhecimento da escolha e cultivo de espécies que realmente possam trazer bem-estar e não prejuízos à saúde, como é o caso de *Piper* com potenciais tóxicos (BARBOSA *et al.*, 2013).

5.6 Análise do potencial alelopático

O EB e frações influenciaram o IVG, o comprimento total das plântulas, do hipocótilo e da radícula de alface e cebola, em todas as concentrações testadas (Figura 21). Os perfis adquiridos foram dose dependente, com destaque para as concentrações de 500 $\mu\text{g/mL}$, que em geral foram as mais significativas.

Figura 21 - Resultados da inibição percentual e tamanho final de plântulas de *L. sativa* (alface) (A) e *A. cepa* (cebola) (B) submetidas ao extrato bruto e frações de *P. marginatum* (amostras e concentrações)



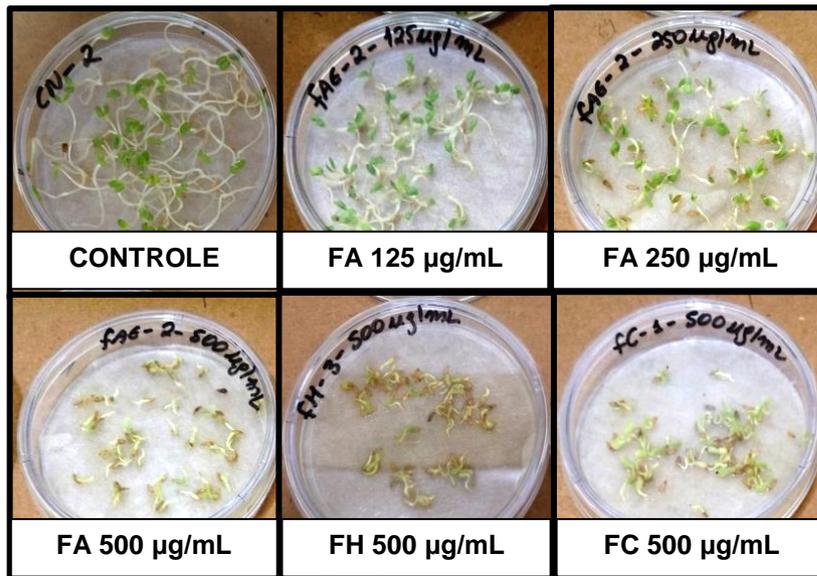
Nota: CN: controle negativo; EB: extrato bruto; FH: fração de hexano; FC: fração de clorofórmio; FA: fração de acetato de etila; FR: fração remanescente; Eixo horizontal: concentrações 0, 125, 250 e 500, em µg/mL.

Fonte: Nunes e Nogueira (2019).

5.6.1 Ensaio de germinação e crescimento de alface (*L. sativa*)

O EB e frações influenciaram o IVG, o comprimento do hipocótilo e da radícula de alface em todas as concentrações testadas, evidenciando efeito alelopático significativo, com destaque para a fração FA 500 µg/mL (Figura 22).

Figura 22 – Placas mostrando diminuição de tamanho das plântulas de alface à medida que as concentrações de extrato bruto e frações foram aumentadas



Nota: EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente.

Fonte: Nunes (2018).

O EB e frações influenciaram o IVG das plântulas de alface em todas as concentrações testadas (ANOVA (5,48) $F = 1897,0$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 8510,7$ $p < 0,0001$). Constatou-se ainda que a interação entre as frações e as concentrações teve diferença significativa (ANOVA (8,48) $F = 286,8$ $p < 0,0001$) (Tabela 5).

O EB e as frações, em todas as concentrações, exerceram efeito sobre o comprimento total das plântulas de alface (ANOVA (5,48) $F = 284,60$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 1969,36$ $p < 0,0001$), com diferença e significativa interação entre as frações e as concentrações (ANOVA (8,48) $F = 31,33$ $p < 0,0001$) (Tabela 5).

O EB e as frações, em todas as concentrações, influenciaram negativamente o alongamento do hipocótilo das plântulas de alface (ANOVA (5,48) $F = 449,4$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 1916,9$ $p < 0,0001$). A interação entre as frações e as concentrações foi significativa (ANOVA (8,48) $F = 30,90$ $p < 0,0001$) (Tabela 5).

Foi constatado que o EB e as frações, em todas as concentrações, tiveram efeito sobre o comprimento da radícula das plântulas de alface (ANOVA (5,48) $F = 104,8$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 1022,5$ $p < 0,0001$). A interação entre as frações e as concentrações foi significativa (ANOVA (8,48) $F = 33,1$ $p < 0,0001$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o EB e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de *P. marginatum* para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, comprimento total, comprimento do hipocótilo e comprimento da radícula das plântulas de alface

Tratamento	Grau de Liberdade	Valor de F	Valor de p
IVG			
Frações	5	1897,0	0,0001*
Concentrações	2	8510,7	0,0001*
Interação	8	286,8	0,0001*
COMPRIMENTO TOTAL			
Frações	5	284,60	0,0001*
Concentrações	2	1969,36	0,0001*
Interação	8	31,33	0,0001*
COMPRIMENTO HIPOCÓTILO			
Frações	5	449,40	0,0001*
Concentrações	2	1916,90	0,0001*
Interação	8	39,90	0,0001*
COMPRIMENTO RADÍCULA			
Frações	5	104,8	0,0001*
Concentrações	2	1022,5	0,0001*
Interação	8	33,1	0,0001*

Nota: *houve diferença significativa; valores mais altos de F (teste de comparação de variâncias) indicam correlações mais fortes; probabilidade de significância (p); índice de velocidade de germinação (IVG).

Fonte: Nunes (2018).

Foi possível concluir que todas as frações e EB diminuíram o IVG da alface em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$), e que as frações FA 500 $\mu\text{g/mL}$ e FH 500 $\mu\text{g/mL}$ exibiram maior efeito sobre o IVG das plântulas de alface quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$) (Figura 23).

O EB e frações diminuíram o comprimento total das plântulas de alface, onde a fração FA 500 $\mu\text{g/mL}$ exerceu maior efeito alelopático quando comparada ao controle ($p < 0,0001$) (Figura 23).

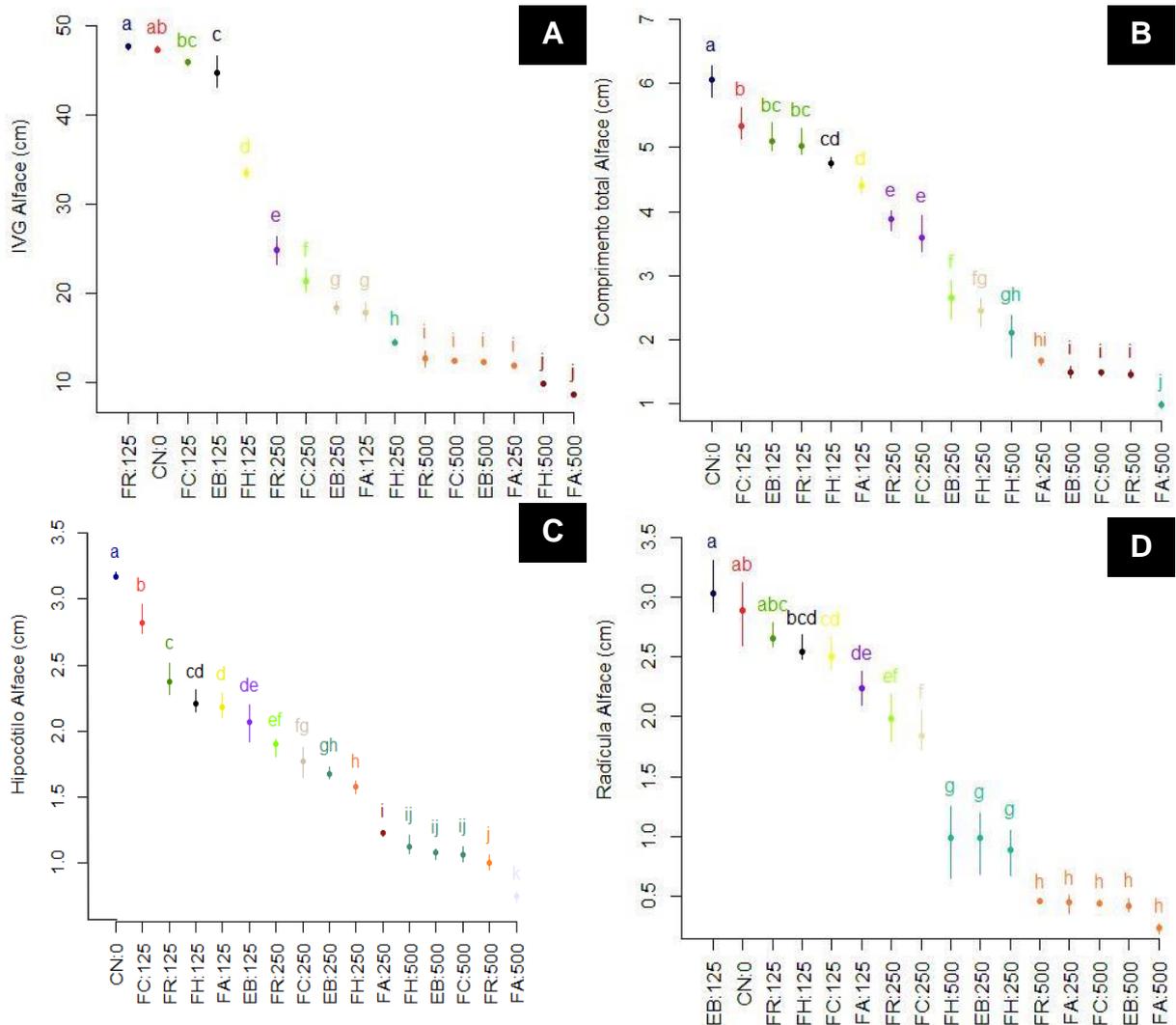
Para o hipocótilo, foi constatado que a fração FA 500 $\mu\text{g/mL}$ exibiu maior efeito alelopático e diminuiu o alongamento do hipocótilo das plântulas de alface quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$) (Figura 23).

A fração FA 500 $\mu\text{g/mL}$, o EB 500 $\mu\text{g/mL}$, a fração FC 500 $\mu\text{g/mL}$, a fração FR 500 $\mu\text{g/mL}$ e a fração FA 250 $\mu\text{g/mL}$ foram muito próximas, e tiveram melhor desempenho ao diminuir o comprimento das radículas das plântulas de alface quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$), com destaque para FA 250 $\mu\text{g/mL}$ e para a fração FA 500 $\mu\text{g/mL}$, especialmente para a primeira, que com a metade da

concentração de outras mais efetivas alcançou a mesma atividade (Figura 23). A radícula indicou ser mais sensível à fração FA.

Os constituintes polares como alguns fenólicos podem estar associados ao melhor desempenho dessa fração.

Figura 23 – Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), comprimento total das plântulas (B), alongamento do hipocótilo das plântulas (C) e comprimento da radícula das plântulas de alface (D) submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações de *P. marginatum*



Nota: IVG: índice de velocidade de germinação; EB: extrato bruto; CN: controle negativo – água destilada; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; 0, 125, 250 e 500: concentrações em $\mu\text{g/mL}$; a-k e cores: agrupamento por significância; barra vertical: valores máximos e mínimos; ponto: valor médio; médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Nunes (2018).

5.6.2 Ensaio de germinação e crescimento de cebola (*A. cepa*)

O EB e frações influenciaram o IVG, o crescimento total das plântulas, do hipocótilo e da radícula de cebola, em todas as concentrações testadas (Tabela 6,

Figura 21 e 23), evidenciando efeito alelopático significativo, com destaque para a fração FH 500 µg/mL. Isso sugere que os seus compostos mais ativos são de média a baixa polaridade.

Foi possível verificar que a radícula sofreu maior variação em seu desenvolvimento do que o hipocótilo. Os seus possíveis aleloquímicos presentes apresentaram uma atividade dose dependente em seu perfil.

Foi constatado que o EB e as frações, em todas as concentrações testadas, interferiram no IVG das plântulas de cebola (ANOVA (5,48) $F = 9,099$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 20,317$ $p < 0,0001$). A interação entre as frações e as concentrações foi significativa (ANOVA (8,48) $F = 5,459$ $p < 0,0001$) (Tabela 6).

Foi constatado que o EB e as frações, em todas as concentrações, influenciaram o comprimento total das plântulas de cebola (ANOVA (5,48) $F = 97,26$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 141,53$ $p < 0,0001$). A interação entre as frações e as concentrações foi significativa (ANOVA (8,48) $F = 19,25$ $p < 0,0001$) (Tabela 6).

Foi observado que o EB e frações exerceram influência no alongamento do hipocótilo das plântulas de cebola (ANOVA (5,48) $F = 81,22$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 132,49$ $p < 0,0001$). A interação entre as frações e as concentrações teve diferença significativa (ANOVA (8,48) $F = 17,12$ $p < 0,0001$) (Tabela 6).

Foi constatado que o EB e frações, em todas as concentrações, influenciaram o comprimento da radícula das plântulas de cebola (ANOVA (5,48) $F = 37,505$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 38,192$ $p < 0,0001$). A interação entre as frações e as concentrações também foi significativa (ANOVA (8,48) $F = 7,326$ $p < 0,0001$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o EB e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de *P. marginatum* para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, comprimento total, comprimento do hipocótilo e comprimento da radícula das plântulas de cebola

Tratamento	Grau de Liberdade	Valor de F	Valor de p
IVG			
Frações	5	9,099	0,0001*
Concentrações	2	20,317	0,0001*
Interação	8	5,459	0,0001*
COMPRIMENTO TOTAL			
Frações	5	97,26	0,0001*
Concentrações	2	141,53	0,0001*
Interação	8	19,25	0,0001*
COMPRIMENTO HIPOCÓTILO			
Frações	5	81,22	0,0001*
Concentrações	2	132,49	0,0001*
Interação	8	17,12	0,0001*
COMPRIMENTO RADÍCULA			
Frações	5	37,505	0,0001*
Concentrações	2	38,192	0,0001*
Interação	8	7,326	0,0001*

Nota: *houve diferença significativa; valores mais altos de F (teste de comparação de variâncias) indicam correlações mais fortes; probabilidade de significância (p); índice de velocidade de germinação (IVG).

Fonte: Nunes (2018).

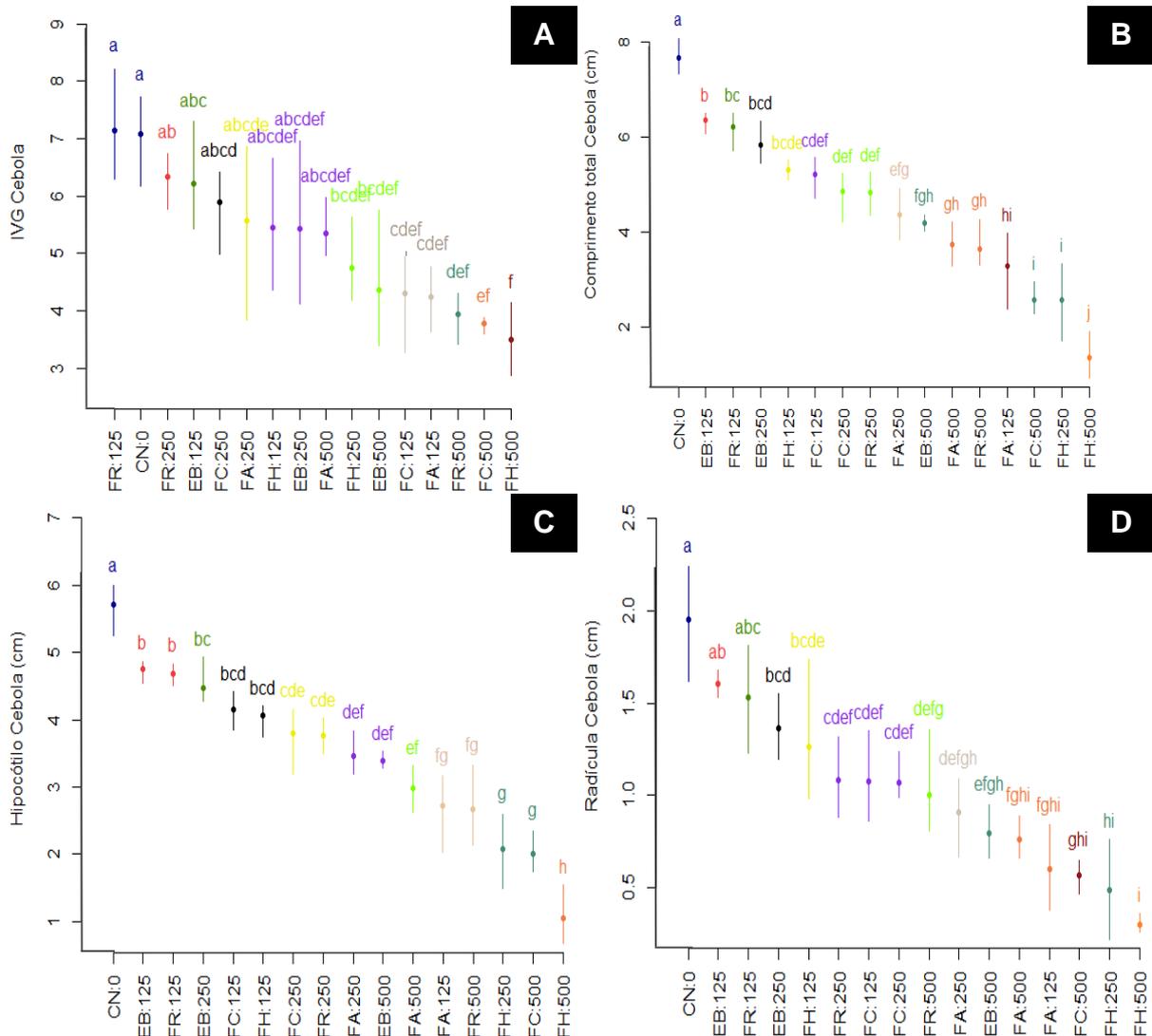
A análise indicou que as frações FH 500 µg/mL, FC 500 µg/mL e FR 500 µg/mL foram mais efetivas e reduziram o IVG da cebola quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$) (Figura 24).

Foi observado que o EB e frações reduziram o comprimento total das plântulas de cebola quando comparadas ao controle ($p < 0,001$), e as frações que tiveram melhor resultado foram a FH 500 µg/mL, FH 250 µg/mL e a FC 500 µg/mL, respectivamente (Figura 24).

Houve influência das frações sobre o alongamento do hipocótilo da cebola, assim, foi verificado que as frações FH 500 µg/mL, FC 500 µg/mL e FH 250 µg/mL exerceram maior influência e reduziram o alongamento do hipocótilo quando comparados ao controle ($p < 0,0001$) (Figura 24).

Todas as concentrações analisadas reduziram o comprimento da radícula das plântulas de cebola quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$), e a fração FH 500 µg/mL foi a mais efetiva (Figura 24).

Figura 24 – Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), comprimento total das plântulas (B), alongamento do hipocótilo das plântulas (C) e comprimento da radícula das plântulas de cebola (D) submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações de *P. marginatum*



Nota: IVG: índice de velocidade de germinação; EB: extrato bruto; CN: controle negativo – água destilada; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; 0, 125, 250 e 500: concentrações em $\mu\text{g/mL}$; a-k e cores: agrupamento por significância; barra vertical: valores máximos e mínimos; ponto: valor médio; médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Nunes (2018).

Este estudo corrobora o que já se tem descrito de outras espécies de *Piper* com relatos de ação alelopática (LUSTOSA *et al.*, 2007; BORELLA *et al.*, 2012). Borella *et al.* (2012) relatou que a espécie *P. mikanianum* exerceu efeito alelopático sobre plântulas de rabanete.

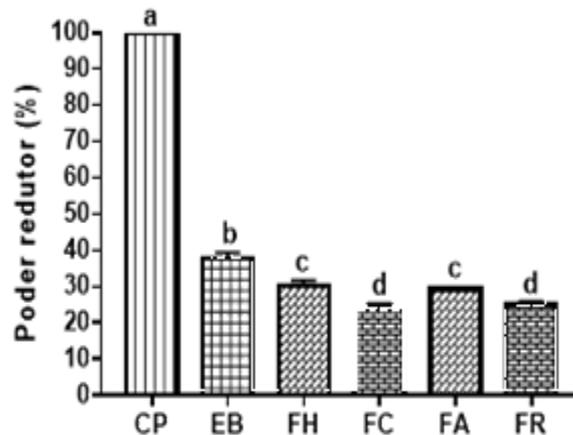
Foi possível verificar que a radícula das plântulas de alface sofreu maior influência no seu desenvolvimento do que o hipocótilo. Sugerindo que os possíveis aleloquímicos presentes podem sensibilizar mais a radícula do que o hipocótilo da alface, e que essa atividade foi dose dependente em seu perfil. Esse achado

concorda com o relato de que uma pequena concentração de aleloquímico pode causar efeitos alelopáticos negativos na alface, interferindo em sua germinação, enraizamento e desenvolvimento geral (CREMONEZ *et al.*, 2013).

5.7 Avaliação do potencial antioxidante pelo método do fosfomolibdênio

Todas as amostras tiveram moderado grau redutor pelo método do fosfomolibdênio, considerando o padrão ácido ascórbico como tendo 100%, na concentração de 200 µg/mL. As médias foram agrupadas em 4 categorias (a, b, c e d) ao serem comparadas ao padrão (a) e entre si, com $p < 0,05$. O EB (Figura 25b) obteve melhor resultado ($37,73\% \pm 1,73$). As frações FH e FA obtiveram perfis semelhantes de redução (Figura 25c) com $30,28\% \pm 1,42$ e $29,28\% \pm 0,54$, respectivamente. A quarta categoria (Figura 25d) e com menores capacidades de redução foi formada pelas frações FC ($24,33\% \pm 1,00$) e FR ($24,83\% \pm 1,17$) (Figura 25).

Figura 25 - Resultados obtidos no ensaio do poder redutor pelo método do fosfomolibdênio, expressos como média \pm desvio padrão, de três amostras de extrato bruto (EB) e frações de *P. marginatum*



Nota: a, b, c, d: agrupamentos por significância de Tukey ($p < 0,05$); CP: controle positivo; EB: extrato bruto; FH: fração hexânica; FC: fração clorofórmica; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente.

Fonte: Nunes (2018).

A capacidade antioxidante pode estar relacionada ao teor de fenólicos. Este resultado era presumível devido à alta concentração de compostos fenólicos observado na determinação de fenóis totais pelo Folin-Ciocalteu (Tabela 3). A

vitexina identificada por CLAE neste estudo e no de Tillequin *et al.* (1978) pode estar relacionada a esta atividade.

5.8 Atividade antibacteriana

Os extratos de EB e frações de *P. marginatum* na concentração testada não foram efetivos para sensibilizar nenhuma das bactérias, como os controles ratificam (Tabela 7).

Tabela 7 – Média dos halos (cm) de inibição bacteriana do EB e frações obtidas das folhas frescas de *P. marginatum* (apenas controle)

Bactérias	Fração-teste concentração diâmetro do halo (cm)						
	EB 100 mg/mL	FH 100 mg/mL	FC 100 mg/mL	FA 100 mg/mL	FR 100 mg/mL	Cloranfenicol (CP) 30 µg/mL	Etanol (CN) 70%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	4,2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	1,8	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	3,2	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	3,1	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	3,1	-

Nota: CN: controle negativo; CP: controle positivo; EB: extrato bruto; FH: fração hexânica; FC: fração clorofórmica; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente.

Fonte: Nunes (2018).

Por causa dos consideráveis teores da quantificação de fenólicos como flavonoides, taninos e antocianinas, presumia-se que as amostras fossem efetivas frente às cepas testadas. Uma vez que a literatura faz ampla associação de atividade antibacteriana à presença de substâncias fenólicas, pois essa classe de metabólitos possui a capacidade de complexar-se com matrizes proteicas extracelulares da membrana bacteriana, provocando morte celular. Flavonoides lipofílicos, sugeridos pela fitoquímica deste trabalho, também podem romper as membranas microbianas (COWAN, 1999; KUMAR; PANDEY, 2013).

Vale ressaltar que uma isoflavona de estrutura definida foi mais eficaz, quando comparada a outras estruturas, para romper a integridade da membrana celular bacteriana e exercer atividade antibacteriana (ARAYA-CLOUTIER, *et al.*, 2018). Os taninos, neste trabalho quantificado com altos teores no EB e frações, têm relatos de ação antibacteriana, inibindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* (MONTEIRO *et al.*, 2005).

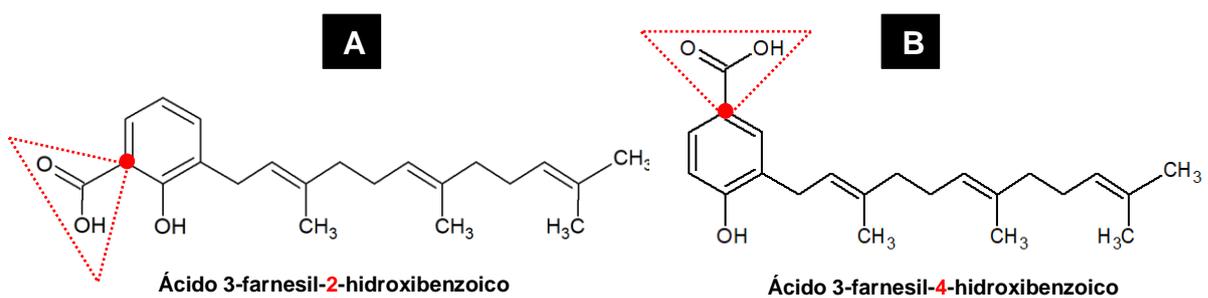
Adicionalmente, em estudos com óleos essenciais de *P. marginatum*, foi identificada alta atividade bactericida frente a *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson e *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Pammel) Dawson, e antifúngica, frente a *Alternaria solani* (SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

Os extratos etanólicos e frações de *P. marginatum* apresentaram alta atividade antibacteriana diante de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), bactérias associadas à periodontite crônica, evidenciando em *P. gingivalis* CIM de 1 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO), com halos de inibição de até 21,7 mm, equiparável ao controle eritromicina 50 UI/mL (GAMBOA *et al.*, 2018).

P. multiplinervium, pertencente filogeneticamente ao complexo *P. marginatum*, possui molécula isolada e sintetizada efetiva contra *Helicobacter pylori* (RÜEGG *et al.*, 2006; MALAMI *et al.*, 2014) análoga a um composto isolado de *P. marginatum* (Figura 26).

Embora as cepas testadas neste trabalho não tenham sido sensibilizadas, outros estudos, como os de sazonalidade e frente a outras cepas, são necessários para apoiar o possível potencial de extratos de *P. marginatum* para produzir moléculas precursoras de antimicrobianos e alelopáticos (CHOU, 2010; MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

Figura 26 – Comparação entre estruturas químicas de uma molécula sintetizada a partir de *P. multiplinervium* efetiva contra *H. pylori* (A) e um composto análogo isolado de *P. marginatum* (B).



Nota: Cor vermelha: para destacar a diferença de posição do substituinte químico.

Fonte: Nunes (2018).

6 CONCLUSÃO

Os caracteres morfoanatômicos descritos das folhas de *P. marginatum* provavelmente possuem um valor taxonômico. Além da forma típica cordada da folha, com margem ciliada e composta por tricomas tectores, a presença de dois tipos de idioblastos secretores parece ser uma característica potencial para a diferenciação dessa espécie das demais *Piper*.

A produção de diferentes compostos pelos idioblastos secretores e células do mesofilo foi demonstrada nos testes histoquímicos, e revelam promissor potencial de *P. marginatum* em futuros estudos fitoquímicos.

Todos os testes fitoquímicos demonstraram concentrações significativas de metabólitos secundários úteis e promissores na química de produtos naturais, e, por CLAE foi identificado o flavonoide vitexina. Essa foi confirmada por técnica de cromatografia à líquido acoplada à espectrometria de massas - LC/MS (resultados em análise por grupo de pesquisa).

O extrato bruto e frações evidenciaram ação alelopática frente à *L. sativa* (alface) e *A. cepa* (cebola), com destaque para as frações acetato de etila e hexânica na concentração de 500 µg/mL, que foram as mais efetivas.

A significativa atividade alelopática e ação antioxidante podem estar associadas ao alto teor de compostos fenólicos das amostras, entre eles a vitexina.

Os dados encontrados neste trabalho podem servir de triagem auxiliar na taxonomia e base para futuros trabalhos filogenéticos. Além disso, podem contribuir para a mensuração do potencial econômico da espécie e para a produção de futuros insumos das indústrias farmacêutica, cosmética e agrônômica.

Adicionalmente os achados botânicos e dados farmacognósticos fornecem parâmetros para o controle de qualidade de potenciais fitoterápicos, além de poder servir de auxílio em estudos de uso seguro de plantas medicinais por povos nativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBIERO, A. L. M. *et al.* Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 4, p. 550-554, 2005b.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 305-312, 2005a.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 379-391, 2006.
- ALMEDA, F.; ASTORGA, L.; ORELLANA, A. *et al.* *Piper* genus: source of natural products with antityrosinase activity favored in phytocosmetics. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 2, n. 6, 2015.
- ALVES, H. S. *et al.* Flavonoides de *Piper carniconnectivum* C,D.C. Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 160-164, 2010.
- ALVES, M. C. S.; TORRES, S. B.; INNECCO, R.; MEDEIROS, S. F. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz da alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução de Diretoria Colegiada nº 10 de 09 de março de 2010**. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a ANVISA e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, em 10 de março de 2010, 2010a.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução de Diretoria Colegiada nº 14 de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, em 5 de abril de 2010, 2010b.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução de Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, em 14 de maio de 2014, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Farmacopéia Brasileira**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. , 2010c. v.1.
- ANYANWU, C. U; NWOSU, G. C. Assessment of the antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of *Piper guineense* leaves. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 10, p. 436-440, 2014.
- ARAÚJO, E. R.; HARAND, W.; LIMA, I. C.; DIAS, F. C. R.; SANTANA, A. A. D.; CARVALHO, R. R. C.; LARANJEIRA, D. Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 49, n. 2, p. 88-94, 2014.

ARAYA-CLOUTIER, C. *et al.* Rapid membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and *Scherichia coli* induced by antibacterial prenylated phenolic compounds from legumes. **Food Chemistry**, v. 240, p. 147–155, 2018.

ASLAM, M. S.; AHMAD, M. S.; MAMAT, A. S. Pharmacological potential of vitexina. **Indian Research Journal of Pharmacy and Science**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2015.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AUTRAN, E. S.; NEVES, I. A.; SILVA, C. S. B.; SANTOS, G. K. N.; CÂMARA, C. A. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2284–2288, 2009.

AZADBAKHT, M.; MIRZAEI, F.; HOSSEINI, A.; JOUYBARI, H. B.; DAVOODI, A. Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 400-408, 2017.

BALESTRIN, L. *et al.* Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiflora* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 230-235, 2008.

BARBOSA, D. R.; LENARDON, L.; PARTATA, A. K. Kava-kava (*Piper methysticum*): uma revisão geral. **Revista Científica do ITPAC, Araguaína**, v.6, n.3, 3, 2013.

BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 553-561, 2008.

BARH, D. *et al.* Exoproteome and secretome derived broad spectrum novel drug and vaccine candidates in *Vibrio cholerae* Targeted by *Piper betel* derived compounds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, n. 4, p. 889-890, 1987.

BARRETO, B. B. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde – a visão dos profissionais envolvidos**. Orientadora: Dr^a Rita de Cássia Padula Alves Vieira. Coorientador: Dr. João Batista Picinini Teixeira. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG, 2011.

BASTOS, J. K.; RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C., EL-SALAM, M. A. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical biology**, v. 56, n. 1, p.253–268, 2018.

- BAY-HURTADO, F.; LIMA, R. A.; TEIXEIRA, L. F.; SILVA, I. C. F.; BAY, M.; AZEVEDO, M. S.; FACUNDO, V. A. Atividade Antioxidante e caracterização do óleo essencial das raízes de *Piper marginatum* Jacq. **Ciência e Natura, Santa Maria**, v. 38, n. 3, p. 1504–1511, 2016.
- BEER, D.; JOUBERT E.; GELDERBLUM, W. C. A.; MANLEY, M. Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. **South African Journal of Enology & Viticulture**, v. 23, n. 2, p. 48-61, 2002.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P.; SASS, J. E. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa State: University Press, 1976.
- BERTOCCO A. R. P. *et al.* Microscopic diagnosis of the leaf and stem of *Piper solmsianum* C.DC. **Microscopy Research & Technique**, v. 80, p. 831-837, 2017.
- BEZERRA, D. P.; FERREIRA, P. M. P.; MACHADO, C. M. L.; AQUINO, N.C.; SILVEIRA, E.R.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C. Antitumour efficacy of *Piper tuberculatum* and piplartine based on the hollow fiber assay. **Planta Medica**, v. 81, p. 15–19, 2015.
- BEZERRA, D.; CASTRO, F.; ALVES, A.; PESSOA, C.; MORAES, M.; SILVEIRA, E.; LIMA, M.; ELMIRO, F.; COSTA-LOTUFO, L. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 801–807, 2006.
- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, v. 18, p. 6852-6865, 2013.
- BLUM, U. Allelopathic interactions involving phenolic acids. **Journal of Nematology**, v. 28, p. 259-267, 1996.
- BLUM, U.; GERIG, T. M.; WORSHAM, A. D.; KING, L. D. Modification of allelopathic effects of p-coumaric acid on morningglory seedling biomass by glucose, methionine, and nitrate. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p. 2791-2811.
- BORELLA, J.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z.; AMARANTE, L.; MORAES, D. M.; VILLELA, F. A. Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikianium* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 415-420, 2012.
- BOSQUIROLI, L. S.; DE MARQUE, D. P.; RIZK, Y. S.; CUNHA, M. C.; MARQUES, M. C. S.; MATOS, M. F. C.; KADRI, M. C.; CAROLLO, C. A.; ARRUDA, C. C. In vitro anti-leishmania infantum activity of essential oil from *Piper angustifolium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 124-128, 2015.
- BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de

Cissus verticillata (L.) e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006**. Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

CAMARA, C.; RIBEIRO, N.; RAMOS, C. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean journal of agricultural research**., v. 76, n. 1, 2016.

CARVALHO, S. M. F.; RIBEIRO, D.G. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 377-390, 2005.

CATUNDA, M. G.; FREITAS, S. P.; OLIVEIRA, J. G.; SILVA, C. M. M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de Abacaxi (*Annanas comosus*). **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 115- 121, 2005.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHAKRABORTY, D.; SHAH, B. Antimicrobial, anti-oxidative and anti-hemolytic activity of *Piper betel* leaf extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 192–199, 2011.

CHAN, E. W. C.; WONG, S. K. Phytochemistry and pharmacology of three *Piper* species: an update. **International Journal of Pharmacognosy**, v.1, n. 9, p. 534-544, 2014.

CHANDRA, P.; PANDEY, R.; SRIVASTVA, M.; RAMESHKUMAR, K.; KUMAR, B. Quantitative determination of chemical constituents of *Piper* spp. using UPLC–ESI–MS/MS. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 967-976, 2015.

CHANG, C. *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHAVES, M. C.; JÚNIOR, A.G.F.; SANTOS, B.V.O. Amides from *Piper tuberculatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 74, p. 181-183, 2003.

CHENG, F.; CHENG, Z. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. **Front. Plant Sci.**, v. 6, n. 1020, 2015.

CHOU, C. Biochemical Interactions among plants: Allelopathy as ecosystem regulator. In: UNESCO. **Encyclopedia of life support systems (EOLSS):** Physiology and maintenance , 2010. v.5. Disponível em: <https://www.eolss.net/Sample-Chapters/C03/E6-54-10-05.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2019.

CHOU, C. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 18, p. 609-636, 1999.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

CHUNG, K.; T. Y. WONG; C. WEI , Y. HUANG; LIN, Y. Tannins and Human Health: A Review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Published online**, v. 38, n. 6, p. 421-46403, 2010.

CIPOLLINI, D. *et al.* Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic ant anti-herbivore effects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, n. 2, p. 144-152, 2008.

CLIFTON, P. Plant sterol and stanols-comparison and contrasts. Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: is there a difference? **Atherosclerosis Supplements**, v. 3, p. 5-9, 2002.

CONDE-HERNÁNDEZ L. A.; GUERRERO-BELTRÁN, J. Á. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. **Food Chemistry**, v. 142, n. 2014, p. 455–460, 2014.

CORTEZ, P. A.; SILVA, D. C.; CHAVES, A. L. F. **Manual prático de morfologia e anatomia vegetal**. Ilhéus, BA : Editus, 2016.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents, **Clinical microbiology reviews**, p. 564-582, 1999.

CREMASCO, M. A.; BRAGA, N. P. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) para a obtenção de isosafrol. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 737-740, 2010.

CREMONEZ, F. E.; CREMONEZ, P. A.; CAMARGO, M. P.; FEIDEN, A. Principais plantas com potencial alelopático encontradas nos sistemas agrícolas brasileiros. **Acta Iguazu, Cascavel**, v.2, p. 70-88, 2013.

CURVELO, J. A. R.; MARQUES, A. M.; BARRETO A. L. S.; ROMANOS, M. T. V. M.; B., PORTELA, KAPLAN M. A. C.; SOARES, R. M. A. A novel nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum* modulates *Candida albicans* biofilm. **Journal of Medical Microbiology**, v, 63, p. 697–702, 2019.

CUTTER, E.G. **Anatomia Vegetal: parte II. Órgãos, Experimentos e Interpretações**. São Paulo: Ed. Roca, 2002.

DA COSTA, S. C. T. **Fungos endofíticos e extratos vegetais no controle alternativo da mancha-alvo do tomateiro**. Orientadora: Dra. Jânia Lília da Silva

Bentes Lima. Coorientadora: Prof^a. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza. 2018. 98f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2018.

CUNHA, L. C. da; OLIVEIRA, R. B. de; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES M. C.; PAULA, J. R. de; COSTA, E. A. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

Da SILVA, J. K. R.; PINTO, L.C.; BURBANO, R.M.R.; MONTENEGRO, R. C.; GUIMARÃES, E. F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55-60, 2014.

DA SILVA, J. K. R.; SILVA, J. R. A.; NASCIMENTO, S. B.; LUZ, S. F. M.; MEIRELES, E. N.; ALVES, C. N.; RAMOS, A. R.; MAIA, J. G. S. Antifungal Activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* Infection in Black Pepper. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17926-17942, 2014.

DAKSHA, A. *et al.* Estimation of sterols content in edible oil and ghee samples. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Maharashtra – India, v. 5, n^o 21, p. 135-137, 2010.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris**, Série D 258, p. 1338-1340, 1964.

De NÚÑEZ, E.H., JOHNSON, C.H. A preliminary study of *Piper marginatum* Jacq. **J Am Pharm Assoc**, v. 32, n. 9, p. 234-236, 1943.

De PAULA, C. S. **Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., Fabaceae.** Orientadora: Dr.^a Marilis D. Miguel. Coorientador: Dr. Obdúlio G. Miguel. 2014. 229 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná – Curitiba-PR, 2014.

DERE, S; GÜNES, T; SIVACI, R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. **TR. Journal of botany**, v. 22, p. 13-17, 1998.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 2.ed. London: West Sussex John Wiley & Sons, 2002.

DÔRES, R.G.R. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth).** Orientador: Dr. Vicente Wagner Dias Casali. 2007. 396 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 241- 249, 2007.

DOS SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; FERNANDES, C. F.; SILVA, A. G.; FACUNDO, V. A. Antifungal activity of *Piper marginatum* L. (Piperaceae) essential oil on in vitro *Fusarium oxysporum* (SCHLECHT). **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 09-14, 2011.

DUARTE, M. R., SIEBENROCK M. C. N. Caracteres Anatômicos de Folha e Caule de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud., Piperaceae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 45-51, (2010).

ELE, M. *et al.* A review on the phamacological effects of vitexina and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.

FACUNDO, V.S. *et al.* Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 733-742, 2008.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O .; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/UFSC, p.197-220, 2003.

FELIPE, F.C.B.; SOUSA-FILHO J.T.; SOUZA L.E.O.; SILVEIRA J.A.; UCHOA D.E.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L.; VIANA, G.S.B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 605–612, 2007.

FERREIRA, M. G. P. R.; KAYANO, A. M.; SILVA-JARDIM, I.; DA SILVA, T. O.; ZULIANI, J. P.; FACUNDO, V. A.; CALDERON L. A.; ALMEIDA-e-SILVA, A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Rev. bras. Farmacogn**, v. 20, n. 6, p. 1003-1006, 2010.

FERREIRA, D. L. R. **Plantas medicinais utilizadas em 9 comunidades rurais de Itacoatiara e aspectos anatômicos e histoquímicos de duas Espécies (*Pogostemon cablin* Benth e *Tripogandra glandulosa* (Seub.) Rohw).** Orientadora: Dr^a Maria Silvia de Mendonça. Coorientadora: Dr^a. Maria Olívia de Albuquerque Ribeiro Simão. 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM, 2016.

FERREIRA, R. O. *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de flavonoides isolados de *Clusia lanceolada* (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 39, nº 9, p. 1093-1097, 2016.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

FOKOUE, H. H. **Síntese, atividades biológicas e estudo de relação estrutura-atividade de piperamidas**. Orientador: Dr. Massuo Jorge Kato. Coorientador: Dr. Marcus Tullius Scotti. 2014. 350p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2014.

FOLIN, O; DENIS, W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 305-308, 1915.

FURR, M.; MAHLBERG, P.G. Histochemical analysis of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **J. Nat. Prod.**, v. 44, p. 153–159, 1981.

GABOR, W.E.; VEATCH, C. Isolation of phytotoxin from quackgrass (*Agropyron repens*) rhizomes. **Weed Science**, v. 29, n. 155, p. 159, 1981.

GAMBOA, F. *et al.* Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on microorganisms associated with periodontal disease. **International Journal of Microbiology**, v. 2018, n. 4147383, 2018.

GANESH, P.; KUMAR, R. S.; SARANRA, P. Phytochemical analysis and antibacterial activity of Pepper (*Piper nigrum* L.) against some human pathogens **Central European Journal of Experimental Biology**, v. 3, n. 2, p. 36-41, 2014.

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundário de plantas. Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GOGOSZ, A. M.; BOEGER, M. R. T.; NEGRELLE, R. R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero. *Piper* (Piperaceae) **Rodriguesia**, v. 63, n. 2, p. 405-417, 2012.

GONG, L. H.; CHEN, X. X.; WANG, H.; JIANG, Q. W.; PAN, S. S.; QIU, J. G.; MEI, X. L.; XUE, Y.Q.; QIN, W. M.; ZHENG, F. Y.; SHI, Z.; YAN, X. J. *Piper longum* induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, n. 906804, 2014.

GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E.S.; QUEIROZ, G.A. **Piperaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12813>> Acesso em: 15 out. 2018. Il. color

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S.. Piperaceae do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguesia**, v. 55, p. 21-46, 2004.

GUZMAN, J. D.; BRÚ, J. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, p. 767–779, 2016.

HANWEN, S.; XUSHENG, G.; YUNKAI, L.; ANBANG, W. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1237, p.1-23, 2012.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA, G.; VIEIRA D. A. Indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

HEREDIA, J. B.; DULCE L. AMBRIZ-PÉREZ; NAYELY LEYVA-LÓPEZ; ERICK P. GUTIERREZ-GRIJALVA. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Food science e technology: Cogent Food e Agriculture**, v. 2, n. 1131412, 2016.

HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledoneas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 16, n. 1-2, p. 1-26, 1974.

HOFFSTADT, R.E. The vascular anatomy of *Piper methysticum*. **Botanical Gazette**, v. 62, n. 2, p. 115-132, 1916.

HWANG, L. S.; WANG, C.; SHEU, M.; KAO, L. Phenolic Compounds of *Piper betle* flower as flavoring and Neuronal activity modulating agents. ACS Symposium, **ACS Symposium Series**, v. 506, n. 1, p. 2000-2013, 1992.

IBRAHIM, S. A.; HAYEK, S. A.; GYAWALI, R. Antimicrobial Natural Products. In: MÉNDEZ-VILAS, A. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. **Formatex Research Center**, v. 2, p. 910-921, 2013.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *allium cepa* l. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

JACQUIN N. J. (1786). **Icones plantarum rariorum**. Lugduni Batavorum, Argentorati Wappler, White et filium, Luchtmans and König, London.

JARAMILLO M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

JARAMILLO, M. A.; CALLEJAS R.; DAVIDSON, C.; SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J. A Phylogeny of the Tropical Genus *Piper* Using ITS and the Chloroplast Intron psbJ– petA. **Systematic Botany**, v. 33, n. 4, p. 647-660, (2008).

JARAMILLO-COLORADO, B. E.; DUARTE-RESTREPO, E.; NAYIVE, P. Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó, Colombia. **Rev. Toxicol**, v. 32, p. 112-116, 2015.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.
KATO, M. J.; M. FURLAN. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure Appl. Chem.**, v. 79, n. 4, p. 529-538, 2007.

KHAN, A.A.; BHATNAGAR, S.P.; SINHA, B.N.; LAL, U. R. Pharmacognostic specifications of eight cultivars of *Piper betle* from eastern region of India. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, p. 176-183, 2013.

- KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A. Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 6, p. 676-687, 2016.
- KRUSE, M.; STRANDBERG, M; STRANDBERG, B. **Ecological effects of allelopathic plants – a review**. Silkeborg: National Environmental Research Institute. Technical Report, n. 315, 2000. Disponível em: <https://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rapporter/fr315.pdf>. Acesso em 25 mai. 2018.
- KUMAR, N.; MISRA, P.; DUBE, A.; BHATTACHARYA, S.; DIKSHIT, M.; RANADE, S. *Piper betle* Linn. a maligned Pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. **Current Science**, v. 99, p. 922-933, 2010.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.1-16, 2013.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos: Washington, 1983.
- LAGO, J. H. G.; CHEN, A.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; OLIVEIRA, A.; KATO, M. J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry**, n. 24, p. 96-98, 2009.
- LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacology e Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.
- LEBOT, V.; LÈVESQUE, J. The origin and distribution of Kava (*Piper methysticum* Forst. F., Piperaceae): a phytochemical approach. **Allertonia**, v. 5, n. 2, p. 223-281, 1989.
- LI, Z.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C.; JIANG, D. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.
- LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. Anthocyanins: a brief review of structural characteristics and stability. **R. Bras. Agrocência, Pelotas**, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.
- LUSTOSA, F. L. F.; OLIVEIRA, S. C. C.; ROMEIRO, L. A.. Efeito Alelopático de Extrato Aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 849-851, 2007.
- MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 2512-2521, 2000.
- MACÍAS, *et al.* **Allelopathy : chemistry and mode of action of allelochemicals**. Flórida: CRC Press LLC, 2005.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MALAMI, I.; GIBBONS, S.; MALKINSON, J. P. Synthesis and antibacterial evaluation of 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid from *Piper multiplinervium*. **Fitoterapia**, v. 93, n. 2014, p. 189–193, 2014.

MARINHO, C. R.; ZACARO, A. A; VENTRELLA, M. C. Secretory cells in *Piper umbellatum* (Piperaceae) leaves: a new example for the development of idioblasts. **Flora**, v. 206, p. 1052-1062, 2011.

MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. Alcaloides como agentes antitumorais : Considerações químicas e biológicas. **Revista Uningá Review**, v. 24, p. 56–61, 2015.

MATHEW, J.; JOSE, S.; YOHANNAN, R.; GEORGE, K. V. Three new species of Piper (Piperaceae) from southern Western Ghats, India. **Annales Botanici Fennici.**, v. 54, p. 267-272, 2017.

McMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948.

MENDES, T. M.; VILLAS BÔAS, G. K. O Papel das Redes Fito na ecologia dos saberes em medicamentos da biodiversidade. In: 2. Simpósio Brasileiro de Saúde e Ambiente, 2014, Belo Horizonte-MG. **Anais Eletrônicos [...]**, ABRASCO, 2014. 10p. Disponível em: <<http://www.sibsa.com.br/site/anaisarquivoresumo>>. Acesso em 23 nov. 2017.

MENDIBURU, F. Package ‘agricolae’, **Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.2-8, 2017.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1965.

MGBEAHURUIKE, E. E.; YRJÖNEN, T.; VUORELA, H.; HOLM, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69. 2017.

MINATEL, I. O. *et al.* Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability, In: Phenolic Compounds - Biological Activity. Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango and Maria del Rosario Garcia-Mateos, **IntechOpen**, 2017. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/phenolic-compounds-biological-activity/phenolic-compounds-functional-properties-impact-of-processing-and-bioavailability>. Acesso em 10 mai. 2019.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN (MOBOT). **Distribuição geográfica da Família Piperaceae**. Missouri:MOBOT, [s.d.]. 1 mapa, color. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/42000020?tab=maps>. Acesso em 18 out. 2018.

MOHAMAD, S.; ZIN, N.M.; WAHAB, H.A.; IBRAHIM, P.; SULAIMAN, S.F.; ZAHARILUDDIN, A.S.M.; NOOR, S.S. M. Antituberculosis potential of some ethnobotanically selected Malaysian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1021-1026, 2011.

MONTEIRO, D. Flora of the canga of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Piperaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1285-1309, 2018.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORAES, M.M., DA SILVA, T.M.G., DA SILVA, R.R., *et al.*, Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat**, v. 13, n. 3, p. 270-277, 2014.

MOTA, M.L.R. **Estudo anti-inflamatório e análise química da casca da *Anacardium occidentale* L.** 1982.184f. Dissertação (Mestrado em química e farmacologia de produtos naturais). - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 1982.

MOURA, T. F. A. L.; SCHENKEL, E.P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, R. I. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze – Plumbaginaceae (Baicuru). **Caderno de Farmácia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, v. 1, n. 1, p. 45-54, 1985.

NAVICKIENE, H. M.; ALECIO, A. C.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.D.; YOUNG, M.C.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626, 2000.

NAVICKIENE, H. M.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J. ; PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 14, p. 281-284, 2003.

NAZ, T.; MOSADDIK, A.; RAHMAN, M.M.; MUHAMMAD, I.; HAQUE, M.E.; CHO, S.K. Antimicrobial, antileishmanial and cytotoxic compounds from *Piper chaba*. **Natural Product Research**, v. 26, p. 979–986, 2012.

NEGREIROS, J. R. S.; MIQUELONI, D. P.; CARTAXO, C. B. C. Yield of essential oil and safrole content based on fresh and dry biomass of long pepper in the Brazilian Amazon. **Acta amazonica**, v. 45, n. 1, p. 75-80, 2015.

NOGUEIRA S.R.P. **Contribuições morfoanatômicas, estudo fitoquímico e de potencial alelopático, antioxidante e antibacteriano do extrato alcoólico e frações de folhas de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae).** Orientador: Dr. Ranieri Campos. Coorientador: Dr. Paulo José de Sousa Maia. 2019. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) – Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Itacoatiara-AM, 2019.

NUNES, J. S. **Coletânea de imagens**: Contribuições em morfoanatomia foliar, fitoquímica, alelopatia e caracteres farmacognósticos preliminares de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae), de Itacoatiara, médio Rio Amazonas. 2017-2019. 20 imagens ou fotografias, color.

NUNES, J. S. **Coletânea de tabelas**: Contribuições em morfoanatomia foliar, fitoquímica, alelopatia e caracteres farmacognósticos preliminares de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae), de Itacoatiara, médio Rio Amazonas. 2017-2019. 6 tabelas.

O'BRIEN, T. P.; MCCYLLY, M. E. **The study of plant structure**: principles and selected methods. Termarcarphi PTY. LTD: Melbourne, 1981.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCYLLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protop**, v. 59, p. 368–373, 1964.

OGBE, R. J.; OCHALEFU, D. O.; MAFULUL, S. G.; OLANIRU, O. B.. A review on dietary phytosterols: Their occurrence, metabolism and health benefits. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 5, n. 4, p. 10-21, 2015.

OKSANEN, J; BLANCHET, F.G.; KINDT R; LEGENDRE P; MINCHIN PR; O'HARA RB; SIMPSON GL; SOLYMOS P; STEVENS MHH; WAGNER H. Vegan: Community Ecology Package. **R package**, version 2.0-10, 2013.

OLIVEIRA, A. K. M; RIBEIRO, J.W.F.; MATIAS, R.; GUSMÃO, D.H.; PEREIRA, K.C.L. Potencial alelopático de folhas frescas de bacupari (*Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana) na germinação de alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 550-553, 2011.

OSTROSKY, E. A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.D.; PRASAD, A.K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.E. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.

PATIL, D. K.; JAIN, A. P. Extraction, Qualitative and quantitative determination of secondary metabolites of *Corchorus Olitorius*. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 1-s, p. 252-255, 2019.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: theoretical and applied. 4ª ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1980.

PEREIRA, J. C. *et al.* **Potencial alelopático e identificação dos metabólitos secundários em extratos de *Canavalia ensiformis* L.** **Rev. Ceres [online]**, v. 65, n. 3, p. 243-252, 2018.

PERFEITO, J. P. S. **O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento.** Orientadora: Drª Dâmaris Silveira. Coorientadora: Drª. Ana Cecília Bezerra Carvalho.

2012. 163 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2012.

PESSINI, G. L. *et al.* Análise farmacognóstica de *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck: Aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. **Latin American Journal Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 209-216, 2003.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 26 de set. 2018.

RABÊLO, G.O.; FERREIRA, A.L.S.; YAMAGUSHI, M.Q.; VESTENA, S. Potencial alelopático de *Bidens pilosa* L. na germinação e no desenvolvimento de espécies cultivadas. **Revista Científica da Faminas**, v.4, n. 1, 2008.

RADÜNZ L.L; MELO, E.C, MACHADO, M.C; SANTOS, R.R.; SANTOS, R. Secagem em camada delgada de folhas de *Lippia sidoides* Cham. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA,30.,2001, Foz do Iguaçu - PR. jul. 2001.**Resumos** [...]. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Engenharia Agrícola, jul. 2001.

RAMAN, V.; GALAL, A. M.; KHAN, I. A. (2012). An investigation of the vegetative anatomy of *Piper sarmentosum*, and a comparison with the anatomy of *Piper betle* (Piperaceae). **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 1135-1144, 2012.

RAMOS, L. S.; DA SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R., *et al.*, Essential oil of *Piper marginatum*. **J Nat Prod.**, v. 49, n. 4, p. 712-713, 1986.

REIGADA, J. B.; TCACENCO C. M.; ANDRADE, L. H.; KATO, M. J.; PORTO, A. L. M.; LAGO, J. H. G. Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) - antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, n. 2007, p. 1054-1058, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBORDIEU, D. **Handbook of enology**. 2ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

RICE, E.L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1984.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. **Allelopathy: Basic and applied aspects**. UK: Chapman & Hall, 1992.

ROCHA, W.S.; LOPES, R.M.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; SILVA, J.P.; AGOSTINI-COSTA, T.S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, p. 1215–1221, 2011.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 6, p. 33–36, 1972.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

RÜEGG, T.; CALDERÓN, A.I.; QUEIROZ, E.F.; SOLÍS, P.N.; MARSTON, A.; RIVAS, F.; ORTEGA-BARRÍA, E.; HOSTETTMANN, K.; M.P. GUPTA. 3-Farnesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 461-467, 2006.

SALATINO, A.; SILVA, J. B. Anatomia e óleo essencial das folhas de *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. var. *regnelli*. **Bol. Botânica, Univ. S. Paulo**, v. 3, p. 95-106, 1975.

SALEHI B.; ZAKARIA Z. A.; GYAWALI R.; IBRAHIM S. A.; RAJKOVIC J.; SHINWARI Z.K.; KHAN T.; SHARIFI-RAD J.; OZLEYEN A.; TURKDONMEZ E.; VALUSSI M.; TUMER T. B.; FIDALGO L. M.; MARTORELL M.; SETZER W. N. *Piper* Species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 1364, 2019.

SALVAGNINI, L. E. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 241-244, 2008.

SÁNCHEZ, Y.; CORREA, T. M.; ABREU, Y.; MARTÍNEZ, B.; DUARTE, Y.; PINO, O. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. **Rev. Protección Veg.**, v. 26, n. 3, p. 170-176, 2011.

SANTOS, A. C. A. *et al.* Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. **R. Interd**, v. 7, n. 3, p. 149-156, 2014.

SANTOS, B. V. O.; CUNHA E. V. L.; CHAVES, M. C. O.; GRAY, A. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1381-1384, 1998.

SANTOS, F. P. *et al.* Flavonóides de *Piper glandulosissimum* Yunker (Piperaceae). **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 1672-1677, 2015.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; OLIVEIRA, C. L. L. G. Medicinal plants used in Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, I, p. 707-720, 2014.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Dress, Ames: Iowa Stat College, 1951.

SEQUEDA-CASTAÑEDA, L.G.; CÉLIS, C; GUTIÉRREZ, S.; GAMBOA, F. *Piper marginatum* jacq. (piperaceae): phytochemical, therapeutic, botanical insecticidal and phytosanitary uses. **Pharmacology OnLine. Archives**, v. 3, p. 136-145, 2015.

SHARKAR, P.; RAHMAN, M.M.; HAQUE MASUM, G.Z.; NAYEEM, M.A.; HOSSSEN, M.M.; AZAD, A.K. Ethnomedicinal importance of the plants in villages in Kushtia

Sador and Mirpur Upozila, Bangladesh. **Journal of Herbs Spices e Medicinal Plants**, v. 19, p. 401-417, 2013.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; COSTA, R. M. R.; TEIXEIRA F. M.; BARBOSA, W. L. R. Processing and quality control of herbal drugs and their derivatives, quality control of herbal medicines and related areas, Prof. Yukihiro Shoyama (Ed.). **InTechOpen**. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/quality-control-of-herbal-medicines-and-relatedareas/processing-and-quality-control-of-herbal-drugs-and-their-derivatives>. Acesso em 25 abr. 2019.

SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* (Piperaceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 2, p. 117-124, 1999.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; FAIAL, K. C. F. MENDONÇA, M. S. Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: valuable assessment for its quality control. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 20-33, 2017.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; MENDONÇA, M. S. Rosetas e concreções cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 435-446, 2014.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. edição, Florianópolis: UFSC, 2007.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; DO CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 35, n. 3, p.748-755, 2005.

SUWANPHAKDEE, C.; SIMPSON, D. A.; HODKINSON, T. R.; CHANTARANOTHAI, P. Taxonomic notes on the genus *Piper* (Piperaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 34, p. 605-618, 2016.

SUWITCHAYANON, P.; KUNASAKDAKUL, K.; KATO-NOGUCHI, H. Screening the allelopathic activity of 14 medicinal plants from Northern Thailand. **Environ. Control Biol.**, v. 55, n. 3, p. 143-145, 2017.

TAMULY, C.; HAZARIKA, M.; BORA, J.; GAJUREL, P.R. Antioxidant activities and phenolic content of *Piper wallichii* (Miq.) Hand.-Mazz. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 2, p. 309–320, 2014.

TEKWU, E.M.; ASKUN, T.; KUETE, V.; NKENGFACK, A.E.; NYASSE, B.; ETOA, F.; BENG, V.P. Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethno-

medically used against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 374-382, 2012.

THIESEN, L. A.; PINHEIRO, M. V. M.; HOLZ, E.; FONTANA, D. C.; SANTOS, J. Pearson correlation between photosynthetic pigments and phytomass of plants of *Aloysia triphylla*. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 2, n. 3, p. 249-257, 2017.

TILLEQUIN, F.; PARIS, M.; JACQUEMIN, H.; PARIS, R. R. Flavonoides de *Piper marginatum*: isolement d'un nouvel hétéroside flavonique le marginatoside. **Planta Medica**, v. 33, n. 43, p. 46-52, 1978.

TSAI, I.L.; LEE, F.P.; WU, C.C.; DUH, C.Y.; ISHIKAWA, T.; CHEN, J.J.; CHEN, Y.C.; SEKI, H.; CHEN, I.S. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. **Planta Medica**, v. 71, p. 535-542, 2005.

UGUSMAN, A.; ZAKARIA, Z.; HUI, C. K.; NORDIN, N. A. M. M.; MAHDY, Z. A. Flavonoids of *Piper sarmentosum* and its cytoprotective effects against oxidative stress. **EXCLI Journal**, v. 11, p. 705-714, 2012.

UMOH, I.; OYEBADEJO, S.; BASSEY, E.; UDOH, N. Histomorphological study of the effect of chronic consumption of *Abelmoschus esculentus* and *Piper guineense* on the gastric mucosa of Albino wistar rats. **International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences**, v. 2, p. 31-37, 2013.

VAN DER BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. Museu Paraense Emílio Goeldi: Belém, 1982.

VASCO, A. *et al.* Preparation of samples for leaf architecture studies, a method for mounting cleared leaves. **Applications in Plant Sciences**, v. 9, p. 1-4, 2014.

VASQUES, S. R.; NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MEDA, C. I.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Wisconsin - Madison, p. 782-799, 2000.

WADT, L. H. O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P.Y. Genetic diversity of "Pimenta Longa" genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genet Mol, Biol**, v. 27, p. 74-82, 2004.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH T.; SAMAIN, M. D. Q.; NEINHUIS C. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, n. 2, p. 477-497, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The promotion and development of traditional medicine: report of a WHO meeting. In: WHO Meeting on the Promotion and Development of Traditional Medicine, 1977, Geneva. **Relatório...** Geneva: World

Health Organization, 1978. Disponível em:
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/40995>. Acesso em 20 jun. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO traditional medicine strategy: 2014-2023**. Switzerland: World Health Organization, 2013. **Disponível em:**
http://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/publications/trm_strategy14_23/en/. Acesso em 22 nov. 2018.

XUAN, T. D.; FUKUTA, M.; WEI, A. C.; ELZAAWELY, A. A.; KHANH, T. D.; TAWATA, S. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. **J Nat Med**, v. 62, p. 188–194, 2008.

YANG, C.; LEE, C.; CHOU, C. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply-orientation. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 43 p. 299-304, 2002.

YANG, S.; CHEN, P. Cambial variations of *Piper* (Piperaceae) in Taiwan. **Bot Stud**, v. 58, n. 17, 2017.

YANO, M. *et al.* Investigação da atividade farmacológica de espécies de *Piper* que ocorrem no cerrado. **Revista Fitos**, v. 7, n. 2, p. 91-98, 2012.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae - A Family Profile. **Brittonia**, v. 10, p. 1-7, 1958.

ZARAI, Z. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, p. 634-641, 2013.

ZHENG, Y. L. *et al.* Integrating novel chemical weapons and evolutionarily increased competitive ability in success of a tropical invader. **New Phytol.**, v. 205, p. 1350-1359, 2015.